

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Biochemie



**Bc. Jitka Rybová**

Patobiochemie Fabryho nemoci a dalších sfingolipidos s poruchou  
funkce  $\alpha$ -galaktosidasy A

Pathobiochemistry of the Fabry disease and other sphingolipidoses  
with  $\alpha$ -galactosidase A dysfunction

**Diplomová práce**

Školitel: Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Praha 2011

**Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova**

Katedra biochemie

Praha

**1. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova**

Ústav dědičných metabolických poruch

Praha

**Patobiochemie Fabryho nemoci a dalších sfingolipidos s poruchou**

**funkce  $\alpha$ -galaktosidasy A**

**Pathobiochemistry of the Fabry disease and other sphingolipidoses**

**with  $\alpha$ -galactosidase A dysfunction**

Školitel: Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc

Konzultanti: RNDr. Jana Ledvinová, CSc.

RNDr. Befekadu Asfaw, CSc.

Školní rok: 2010/2011

Bc. Jitka Rybová

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce a její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9.5.2011

Podpis:

## Abstract

Fabry disease is an inherited defect of lysosomal  $\alpha$ -galactosidase A ( $\alpha$ -GALA), causing progressive accumulation of glycosphingolipids with terminal  $\alpha$ -galactosyl moieties, especially globotriaosylceramide (Gb<sub>3</sub>Cer) and in to a small extent also galabiosylceramide (Ga<sub>2</sub>Cer) and blood group B glycolipids, in most tissues and body fluids.

This diploma thesis is an extension of previous laboratory studies and intends to contribute to clarification of some specific features of catabolic pathways of glycolipids substrates in lysosomal storage disorders, especially blood group B glycolipids. Therefore, analysis of human pancreas and lungs tissues was performed using TLC imunodetection and immunohistochemical analysis of these glycolipids. The most striking observation was massive accumulation of B-6-2 glycolipid and of others complex B-glycolipids in the pancreas of the patient with Fabry disease with blood group B. The level of blood group B substrates exceeded significantly storage of Gb<sub>3</sub>Cer substrate.

An important part of this work were metabolic experiments in cell cultures in order to answer the question about participation of related glycosidases –  $\alpha$ -galactosidase A and  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase ( $\alpha$ -NAGA) in the lysosomal degradation of glycosphingolipids with terminal  $\alpha$ -galactose.

Loading experiments were performed using labeled [<sup>3</sup>H]B-6-2 glycolipid in the cultures of skin fibroblasts of patients with  $\alpha$ -GALA,  $\alpha$ -NAGA deficiencies, with prosaposin and saposin B deficiencies. In the cells with deficient activity of  $\alpha$ -GALA, block in the first stage of degradation of the substrate B-6-2 glycolipid (cleavage of terminal  $\alpha$ -galactose), was not found. This result may suggest the participation of  $\alpha$ -NAGA in the cleavage of natural substrates of  $\alpha$ -GALA. Similarly, when activities of  $\alpha$ -GALA and  $\alpha$ -NAGA were measured *in vitro* with fluorogenic substrate, residual activity was observed. This activity was inhibited using N-acetylgalactosamine and is attributable to  $\alpha$ -NAGA.

In the cells with the deficiency of prosaposin, first steps of B-6-2 glycolipid degradation were normal. Expected blocks in the degradation pathway were observed at the level of oligosaccharide chain with four and two sugars containing ( $\beta$ 1→4) galactose.

Finally, a preparation procedure of non-radioactively labeled Gb<sub>4</sub>Cer (C19:0 Gb<sub>4</sub>Cer) was designed using commercial SCDase. This compound would replace radioisotope-labeled substrate [<sup>3</sup>H]Gb<sub>4</sub>Cer in future metabolic studies.

(In Czech)

## Abstrakt

Fabryho choroba je dědičný defekt lysosomální  $\alpha$ -galaktosidasy A ( $\alpha$ -GALA), který způsobuje postupné ukládání glykosfingolipidů s terminální  $\alpha$ -galaktosou, zejména globotriosylceramidu ( $\text{Gb}_3\text{Cer}$ ) a v menší míře také galabiosylceramidu ( $\text{Ga}_2\text{Cer}$ ) a glykolipidů krevní skupiny B v mnoha tkáních a tělních tekutinách.

Tato diplomová práce navazuje na předchozí studie laboratoře a jejím záměrem je přispět k objasnění některých specifit katabolické dráhy glykolipidových substrátů u dědičných lysosomálních poruch, především glykolipidů krevní skupiny B. Byla proto provedena TLC imunodetekční analýza a imunohistochemická analýza těchto glykolipidů v lidském pankreatu a plicní tkáni. Pozoruhodným nálezem v pankreatu pacienta s FD a krevní skupinou B bylo masivní ukládání B-6-2 glykolipidu a dalších složitých B-glykolipidů oproti klasickému substrátu  $\text{Gb}_3\text{Cer}$ .

Důležitou součástí této práce byla i příprava a provedení metabolických experimentů v buněčných kulturách, které by pomohly zodpovědět otázku spoluúčasti příbuzné glykosidasy –  $\alpha$ -N-acetylgalaktosaminidasy ( $\alpha$ -NAGA) při lysosomální degradaci glykosfingolipidů s terminální  $\alpha$ -galaktosou. Byly provedeny zátěžové experimenty pomocí značeného [ $^3\text{H}$ ]B-6-2 glykolipidu v kulturách kožních fibroblastů pacientů s deficitem  $\alpha$ -GALA, s deficitem  $\alpha$ -NAGA, s prosaposinovým deficitem a deficitem saposinu B. V buňkách s deficitem  $\alpha$ -GALA nebyl zjištěn blok v prvním stupni degradace substrátu B-6-2 glykolipidu, kdy je odštěpována terminální  $\alpha$ -galaktosa. Tento výsledek může nasvědčovat účasti  $\alpha$ -NAGA na štěpení přirozených substrátů  $\alpha$ -GALA. K obdobnému zjištění vedlo stanovení aktivit  $\alpha$ -GALA a  $\alpha$ -NAGA *in vitro* s fluorogenním substrátem, kdy byla v buňkách FD pacientů prokázána reziduální aktivita vůči fluorogennímu  $\alpha$ -galaktosidu inhibovatelná N-acetylgalaktosaminem.

V buňkách s deficitem prosaposinu probíhala počáteční degradace B-6-2 glykolipidu normálně a blok v odbourávání sacharidového řetězce byl dle očekávání pozorován až na úrovni glykolipidu se čtyřmi a dvěma cukry s vazbou ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) galaktosy.

Závěrem práce byl navržen postup přípravy  $\text{Gb}_4\text{Cer}$  s neradioaktivní značkou ( $\text{C}_{19:0} \text{Gb}_4\text{Cer}$ ) pomocí komerční SCDasy, který by v dalších metabolických studiích nahradil substrát značený radioisotopem.

## Poděkování

Ráda bych poděkovala zejména svým konzultantům RNDr. Janě Ledvinové, CSc a RNDr. Befekadu Asfawovi, CSc za velké množství cenných rad a jejich odborné vedení během zpracování této práce.

Dále bych ráda poděkovala svému školiteli Prof. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc, za odborný dohled a konzultace mé práce.

Chtěla bych poděkovat také Mgr. Ladislavovi Kuchařovi, Ing. Heleně Poupětové, Ing. Jitce Honzíkové, Michaela Fialové a celému kolektivu z Ústavu metabolických dědičných poruch 1. LF UK za jejich pomoc a vytvoření přátelské atmosféry.

Velice děkuji Prof. MUDr. Milanu Ellederovi, DrSc.a MUDr. Heleně Hůlkové, PhD za odborné rady z oblasti histologie. Paní Marii Kolářové z histologické laboratoře děkuji za pomoc při přípravě tkáňových řezů.

Mé díky dále patří Mgr. Tomášovi Petrovi z Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky za umožnění denzitometrických měření a veškerou pomoc.

Na závěr chci poděkovat své rodině a přátelům za jejich podporu a trpělivost během celého mého studia.

Tato práce byla podpořena výzkumnými granty:

VZ MSM 0021620806 Molekulární biologie a patologie buňky

GAUK č. 19509 Tandemová hmotnostní spektrometrie sfingolipidů

# Obsah

<b>Abstract .....</b>	<b>3</b>
<b>Abstrakt.....</b>	<b>4</b>
<b>Poděkování .....</b>	<b>5</b>
<b>Seznam zkratk.....</b>	<b>8</b>
<b>1. Teoretický úvod .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1. Historie.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2. Úloha a funkce GSL.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3. Struktura a názvosloví glykosfingolipidů .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4. Základní struktury GSL .....</b>	<b>12</b>
1.4.1. Základní struktury a skupina neutrálních GSL .....	12
1.4.2. Skupina kyselých GSL.....	13
<b>1.5. Biosyntéza sfingolipidů a glykosfingolipidů .....</b>	<b>13</b>
<b>1.6. Katabolismus sfingolipidů a glykosfingolipidů .....</b>	<b>15</b>
1.6.1. Degradace GSL s méně než čtyřmi sacharidovými jednotkami .....	16
<b>1.7. Dědičné poruchy katabolismu sfingolipidů - sfingolipidosy .....</b>	<b>17</b>
1.7.1. Fabryho choroba – deficit aktivity $\alpha$ -galaktosidasy A.....	18
1.7.2. Schindlerova choroba – deficit aktivity $\alpha$ -N-acetylgalaktosaminidasy .....	21
1.7.3. Deficit prosaposinu a saposinu B.....	21
<b>1.8. Antigeny ABO(H) systému.....</b>	<b>22</b>
1.8.1. Genetika antigenů .....	22
1.8.2. Biosyntéza antigenů .....	23
<b>1.9. Metody analýzy glykosfingolipidů.....</b>	<b>24</b>
1.9.1. Metody izolace a chromatografická separace GSL .....	24
1.9.2. Dělení GSL na tenké vrstvě (TLC) a kolonovou chromatografií (HPLC) .....	25
1.9.3. Tandemová hmotnostní spektrometrie.....	25
<b>2. Cíle práce.....</b>	<b>27</b>
<b>3. Materiál a metody .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Materiál.....</b>	<b>28</b>
3.1.1 Chemikálie a další použitý materiál.....	28
3.1.2 Biologický materiál.....	29

<b>3.2. Přístroje .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3. Metody .....</b>	<b>31</b>
3.3.1. Analýza glykolipidů krevní skupiny B v pankreatu a plicní tkáni pacientů s Fabryho chorobou.....	31
3.3.2. Zátěžové experimenty v buněčných kulturách .....	35
3.3.3. Příprava substrátu Gb <sub>4</sub> Cer s neradioaktivní značkou.....	40
<b>4. Výsledky .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1. Analýza glykolipidů krevní skupiny B v pankreatu a plicní tkáni pacientů s Fabryho chorobou .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2. Zátěžové experimenty v buněčných kulturách.....</b>	<b>49</b>
4.2.1. Příprava [ <sup>3</sup> H]B-6-2 glykolipidu .....	49
4.2.2. Analýza kultivovaných kožních fibroblastů: in vitro aktivity enzymů a analýza sfingolipidů .....	49
4.2.3. Vyhodnocení zátěžových experimentů se substrátem [ <sup>3</sup> H]B-6-2 v kulturách kožních fibroblastů .....	52
<b>4.3. Příprava substrátu Gb<sub>4</sub>Cer s neradioaktivní značkou .....</b>	<b>54</b>
<b>5. Diskuse .....</b>	<b>59</b>
<b>5.1. Analýza glykolipidů krevní skupiny B v pankreatu a v plicní tkáni pacientů s Fabryho chorobou .....</b>	<b>59</b>
<b>5.2. Zátěžové experimenty v buněčných kulturách.....</b>	<b>61</b>
5.2.1. Analýza sfingolipidů.....	61
5.2.2. Vyhodnocení zátěžových experimentů se substrátem [ <sup>3</sup> H]B-6-2 v kulturách kožních fibroblastů .....	62
<b>5.3. Příprava substrátu Gb<sub>4</sub>Cer s neradioaktivní značkou .....</b>	<b>63</b>
<b>6. Závěr .....</b>	<b>66</b>
<b>7. Seznam použité literatury.....</b>	<b>68</b>



## Seznam zkratek

<b>BSA</b>	Hovězí sérový albumin
<b>CBE</b>	conduritol B epoxid (inhibitor $\beta$ -glukocerebrosidasy)
<b>CDH</b>	Ceramiddihexosid
<b>Cer</b>	Ceramid
<b>CerS</b>	Ceramid synthasa
<b>CERT</b>	Transportní protein ceramidu (z angl.:Ceramide transporter)
<b>CID</b>	Kolizně indukovaná disociace (z angl.: Collision induced cecomposition)
<b>ESI</b>	Ionizace elektrosprejem (z angl. Elecspray ionisation)
<b>ESI-MS/MS</b>	(z angl. Electrospray ionisation tandem mass spektrometry)
<b>ER</b>	Endoplasmatické retikulum
<b>FAPP2</b>	Transportní protein (z angl.: Four-phosphate adaptor protein 2)
<b>FD</b>	Fabryho choroba
<b>FUT1(2)</b>	Fukosyltransferasa 1(2)
<b>GalCer</b>	Galaktosylceramid
<b>Ga<sub>2</sub>Cer</b>	Galabiosylceramid
<b>Gb<sub>3</sub>Cer</b>	Globotriaosylceramid
<b>Gb<sub>4</sub>Cer</b>	Globotetraosylceramid
<b>GlcCer</b>	Glukosylceramid
<b>GM2</b>	GM2 gangliosid
<b>GSL</b>	Glykosfingolipidy
<b>HPLC</b>	Vysokotlaká kapalinová chromatografie
<b>HPTLC</b>	Vysokotlaká tenkovrstevná chromatografie
<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>LacCer</b>	Laktosylceramid
<b>MBq</b>	MegaBecquerel
<b>MK</b>	Mastná kyselina
<b>MS</b>	Hmotnostní spektrometrie
<b>MRM</b>	Monitorování více reakcí (z angl.: Multi reaction monitoring)
<b>M6P</b>	Manosa-6-fosfát
<b>m/z</b>	Hmotnost/náboj
<b>PBS</b>	Fosfátový puf

<b>PVP</b>	Polyvinylpyrrolidon
<b>Q</b>	Kvadrupól
<b>SAP</b>	Saposin (z angl.: Sphingolipids activator protein)
<b>SCDasa</b>	Sfingolipid ceramid N-deacylasa (EC 3.5.1.69)
<b>SFL</b>	Sfingolipidy
<b>SM</b>	Sfingomyelin
<b>TLC</b>	Tenkovrstevná chromatografie
<b><math>\alpha</math>-GALA</b>	$\alpha$ -galaktosidasa A
<b><math>\alpha</math>-NAGA</b>	$\alpha$ -N-acetylgalaktosaminidasa A
<b><math>\beta</math>-GAL</b>	$\beta$ -galaktosidasa

# **1. Teoretický úvod**

## **1.1. Historie**

Za objevitele glykosfingolipidů (GSL) je obecně považován Johan L. W. Thudichum, který v roce 1884 ve své publikaci s názvem “A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain” identifikoval a charakterizoval některé chemické sloučeniny obsažené v mozku, včetně sfingomyelinu a sfingosinu. Dnes jsou glykosfingolipidy a jejich deriváty předmětem intenzivního studia zaměřeného na objasnění jejich role ve strukturální integritě buněčné membrány, v signalizačních kaskádách a zejména na jejich zapojení při patologických procesech, které jsou příčinou závažných onemocnění [1].

## **1.2. Úloha a funkce GSL**

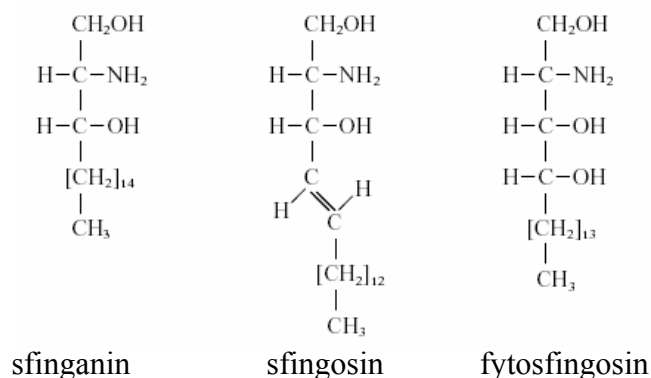
Glykosfingolipidy jsou přítomny u všech obratlovců, rostlin a hub, některých prokaryotických organismů a virů, jako součást buněčných membrán, lipoproteinů a jiných významných biologických struktur. Jsou lokalizovány převážně ve vnější vrstvě plasmatické membrány savčích buněk, kde plní především strukturní funkci. Jejich složení je specifické pro jednotlivé organismy a jejich buněčné typy. Přítomnost glykolipidů ve fosfolipidové dvojvrstvě dodává membráně pevnost a svými sacharidovými strukturami orientovanými vně buňky zprostředkovávají interakce s exogenními ligandy. Komplexní glykosfingolipidy slouží jako adhezí molekul pro proteiny sousedních buněk, bakterií a virů. Ceramid a sfingoidní báze a jejich metabolity slouží jako mediátory intracelulární i extracelulární signalizace.

Jejich chemické vlastnosti jsou vhodné pro vytváření specializovaných mikrodomén plnicích vhodné biologické účely (caveoly a membránové rafty, což je představa rigidních domén GSL a cholesterolu v tekutějším prostředí fosfolipidů a cholesterolu) [2].

## **1.3. Struktura a názvosloví glykosfingolipidů**

Glykosfingolipidy jsou sacharidové deriváty ceramidu nebo sfingoidů, kde jsou sacharidy vázány glykosidovou vazbou k O-1 sfingoidu. Sfingoidy, nebo-li sfingoidní báze, jsou dlouhé

alifatické aminoalkoholy, označující skupinové názvy pro sfinganin (D-erythro-2-aminooktadekan-1,3-diol) a jeho homology, stereoisomery, hydroxy- a nenasycené deriváty. Nejběžnější sfingoidní bázi je (*E*)-sfing-4-enin (D-erythro-1,3-dihydroxy-2-aminooctadec-4-en-1,3-diol), též označovaný jako “sfingosin“. Dalším příkladem sfingoidu je (R)-4-hydroxysfinganin (2-aminooktadekan-1,3,4-triol), někdy označovaný jako fytosfingosin, který je zastoupen především v rostlinách. Strukturní vzorce těchto sfingoidů jsou uvedeny na Obr.1 [3].



**Obr.1: Strukturní vzorce sfinganinu, sfingosinu a fytosfingosinu. Převzato z [3]**

Ceramidy jsou N-acylované sfingoidy. Mastné kyseliny, přirozeně se vyskytující v ceramidech, mohou mít délku uhlíkatého řetězce v rozmezí C<sub>16</sub> až C<sub>26</sub> a obsahovat jednu nebo dvě hydroxylové skupiny v poloze C-2. Pro značnou heterogenitu mastných kyselin a sfingoidních bází bylo výhodné pojmenovat lipidní část jednotným názvem “ceramid“[3].

Glykosfingolipidy lze obecně rozdělit do dvou skupin:

- Neutrální GSL: mono-, oligo- až polyglykosylceramidy
- Kyselé GSL: sialoglykosfingolipidy (gangliosidy, s vázanou kyselinou sialovou)  
sulfoglykosfingolipidy (sulfamidy, s vázanou sulfoskupinou)  
fosfoglykosfingolipidy (fosfomono- nebo diestery)  
fosfonoglykosfingolipidy (obsahují jednu nebo více  
{2-aminoethyl}hydroxyfosforylových skupin)

## 1.4. Základní struktury GSL

### 1.4.1. Základní struktury a skupina neutrálních GSL

Kvůli nomenklaturním problémům s komplexností sacharidové části, byl vytvořen systém užívající pro základní oligosacharidy triviální názvy, vycházející z následujících zásad:

- Počet monosacharidových jednotek v oligosacharidovém řetězci se označuje sufixem --diosa, -triosa, -tetraosa atd.
- Oligosacharidy jsou rozděleny do skupin (nebo-li sérií) podle struktury a bioenergetické příbuznosti.
- Rozdíly ve vazbě mezi sacharidy (např. 1→4 versus 1→3) se označují prefixem iso- nebo neo- (viz.Tab.1).
- Byl vypracován soubor symbolů pro jednoduché znázornění.

Mezi nejjednodušší monoglykosylceramidy (někdy označované jako “cerebrosidy”) obsahující jednu molekulu sacharidu patří:

- $\beta$ -glukosyl(1↔1)ceramid (GlcCer).
- $\beta$ -galaktosyl(1↔1)ceramid (GalCer).

Mezi diosylceramidy patří:

- $\beta$ -D-galaktosyl(1→4) $\beta$ -D-glukosyl(1↔1)ceramid. Pro zjednodušení se užívá triviální název laktosylceramid (LacCer).
- $\alpha$ -D-galaktosyl(1→4) $\beta$ -D-galaktosyl(1↔1)ceramid. Pro zjednodušení se užívá triviální název digalaktosylceramid (GalGalCer).

Laktosylceramid a glukosylceramid jsou prekurzory složitějších glykosfingolipidů, které jsou rozděleny do jednotlivých sérií, podle typu oligosacharidového řetězce (Tab.1) [3].

**Tab.1: Série glykosfingolipidů podle typů oligosacharidového řetězce**

Série	Symbol	Zkratky			
		IV	III	II	I
Ganglio-	Gg	Gal( $\beta$ 1→3)GalNAc( $\beta$ 1→4)Gal( $\beta$ 1→4)Glc( $\beta$ 1→Cer)			
Lakto-	Lc	Gal( $\beta$ 1→3)GlcNAc( $\beta$ 1→3)Gal( $\beta$ 1→4)Glc( $\beta$ 1→Cer)			
Neolakto-	nLc	Gal( $\beta$ 1→4)GlcNAc( $\beta$ 1→3)Gal( $\beta$ 1→4)Glc( $\beta$ 1→Cer)			
Globo-	Gb	GalNAc( $\beta$ 1→3)Gal( $\alpha$ 1→4)Gal( $\beta$ 1→4)Glc( $\beta$ 1→Cer)			
Isoglobo-	iGb	GalNAc( $\beta$ 1→3)Gal( $\alpha$ 1→3)Gal( $\beta$ 1→4)Glc( $\beta$ 1→Cer)			
Muko-	Mc	Gal( $\beta$ 1→3)Gal( $\beta$ 1→4)Gal( $\beta$ 1→4)Glc( $\beta$ 1→Cer)			

(předpona iso- označuje změnu vazby mezi mezi II a III cukrem a předpona neo- označuje změnu vazby mezi III a IV cukrem)

Kvůli obtížnému sestavení systematických názvů pro glykosfingolipidy s delším oligosacharidovým řetězcem, je doporučeno používat semisystematické názvy, ve kterých jsou triviální názvy dané série (kmenové názvy) používány jako předpony. Názvy glykosfingolipidů jsou pak tvořeny obecně:

- (kmenový název)(jeho velikost)sylceramid (např. globotetraosylceramid). To platí i pro GSL s kratším počtem sacharidů, než je typické pro danou sérii (např. laktosylceramid).
- Římskou číslicí se označuje pozice monosacharidu, která se počítá od ceramidu.
- Arabskou číslicí se v indexu lokantu označuje poloha uhlíkatého atomu monosacharidu, kde dochází k rozvětvení řetězce nebo k připojení monosacharidu (nebo jiného substituentu), který není součástí kmenové struktury (např.  $\text{III}^2\text{-}\alpha\text{-fucosylglobotriaosylceramid}$  nebo  $\text{III}^2\text{-}\alpha\text{-Fuc-Gb}_3\text{Cer}$ )[3,4].

#### 1.4.2. Skupina kyselých GSL

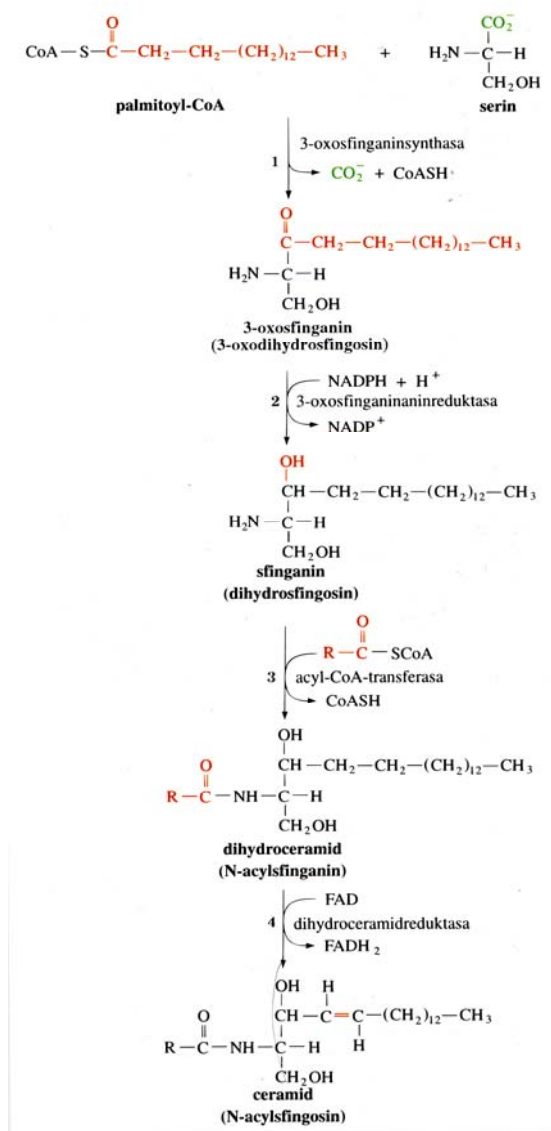
Mezi nejběžnější kyselé glykosfingolipidy patří gangliosidy a sulfoglykosfingolipidy.

Gangliosidy jsou sialoglykosfingolipidy, které mohou být buď N-acetylové nebo N-glykoloyl-neuraminosylové deriváty neutrálních glykosfingolipidů. Názvosloví sialových zbytků i jiných substituentů se řídí stejnými pravidly jako názvosloví monosacharidů, které nejsou součástí kmenové struktury (např.  $\text{II}^3\text{-}\alpha\text{-N-acetylneuraminosylgangliotetraosylceramid}$  nebo  $\text{II}^3\text{-}\alpha\text{-Neu5Ac-Gb}_4\text{Cer}$ ).

Sulfoglykosfingolipidy, někdy nazývané jako sulfatidy, se označují jako sulfátové estery neutrálních glykosfingolipidů nebo jako sulfatoglykosfingolipidy (např. laktosylceramid- $\text{II}^3$ -sulfát nebo  $\text{II}^3\text{-sulfo-LacCer}$ ) [3].

### 1.5. Biosyntéza sfingolipidů a glykosfingolipidů

*De novo* biosyntéza glykosfingolipidů začíná biosyntézou ceramidu, lokalizovanou na cytosolové straně endoplasmatického retikula (ER). Nejprve je ve třech po sobě následujících enzymově katalyzovaných reakcích syntetizován dihydroceramid z L-serinu a dvou molekul acetyl-CoA (viz. str.14, Obr.2). V savčích buňkách převládají sfingoidní báze obsahující 18 uhlíkatých atomů, ale v závislosti na různých tkáních může být i různá délka uhlíkatého řetězce (nejčastěji  $\text{C}_{12-26}$ ). U člověka nalézáme rodinu šesti dihydroceramid synthas (CerS), s různou specifitou pro acetyl-CoA. V širokém spektru tkání je nejvíce zastoupena CerS2, která



**Obr.2: Schéma biosyntézy ceramidu.**  
Převzato z [5]

připojuje mastné kyseliny s uhlíkatým řetězcem C<sub>20-26</sub> na sfinganin, za vzniku dihydroceramidu. Dihydroceramid je nakonec přeměněn dihydroceramid desaturasou na ceramid, který je prekurzorem v biosyntézách složitějších glykosfingolipidů probíhajících v různých částech ER a Golgiho aparátu [6].

V epiteliálních buňkách kůže vzniká vedle ceramidu i fytoceramid, podílející se vedle ostatních GSL na buněčné signalizaci [7].

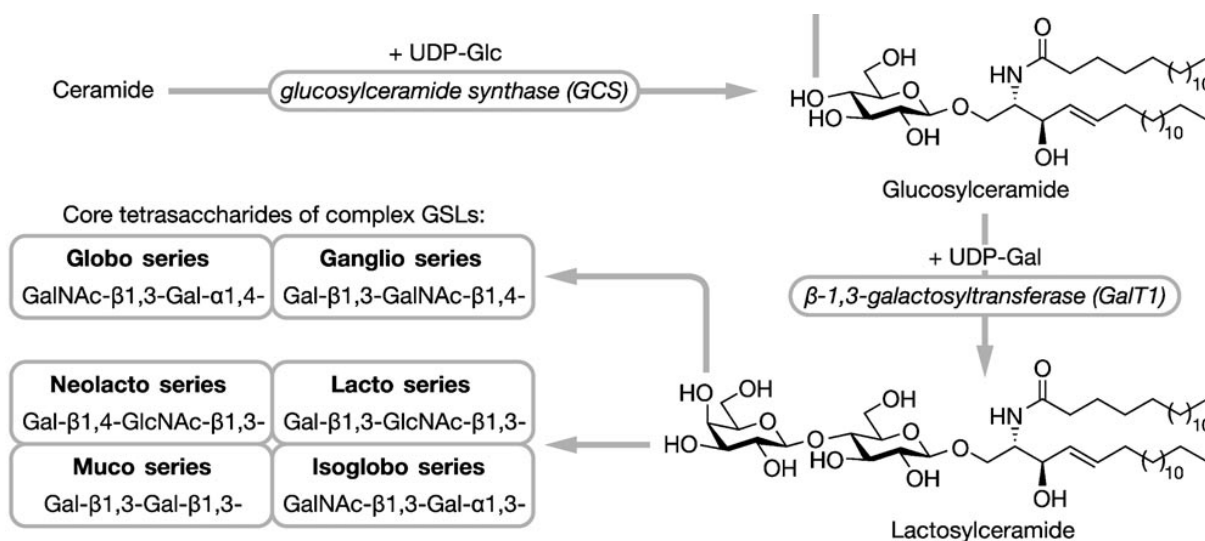
Dalším zdrojem ceramidu je recyklace glykosfingolipidů, kdy v lysosomech dochází k jejich štěpení pomocí kyselých ceramidasy až na sfingosin, který je poté znovu využit v procesu označovaném jako “recycling pathway“. V tomto procesu je sfingosin zpětně acylován ceramid synthasou na ceramid, využívaný v buněčné signalizaci. Rozdílem tedy je, že produktem *de novo* syntézy je sfinganin, zatímco v procesu recyklace GSL se uplatňuje sfingosin, jako produkt lysosomální degradace sfingolipidů [8].

Příkladem biosyntézy sfingolipidů z ceramidu

může být biosyntéza sfingomyelinu. Ceramid je nejprve transportován pomocí transportního proteinu CERT (ceramide transporter) z ER do cytosolu trans-Golgi, kde dochází ke spontánnímu přetočení ceramidu do lumen trans-Golgi. Zde je pak ceramid přeměněn na sfingomyelin reakcí katalyzovanou sfingomyelin synthasou<sup>1</sup>, která na ceramid přenáší fosfocholin z fosfatidylcholinu [6].

Příkladem může být i biosyntéza glukosylceramidu (GlcCer), která probíhá na cytosolové straně cis-Golgi reakcí katalyzovanou glukosylceramid synthasou, která přenáší aktivovanou glukosu s UDP na ceramid. GlcCer je pak transportován FAPP2 (four-phosphate adaptor protein 2) proteinem z místa jeho syntézy do jiných kompartmentů a též do lumen Golgiho aparátu, kde následuje syntéza laktosylceramidu (LacCer) připojením aktivované galaktosy z UDP galaktosy transferasou I. LacCer je pak prekurzorem globo-, ganglio-, lakto- a

neolaktosérie, připojením  $\alpha$ - nebo  $\beta$ - podjednotek glukosy, galaktosy, N-acetylglukosaminu nebo N-acetylgalaktosaminu na 3 nebo 4 OH- skupinu galaktosy LacCer (Obr.3) [9].



**Obr.3: Biosyntéza složitějších glykosfingolipidů enzymově katalyzovanými reakcemi, vycházející z ceramidu. Převzato z [6]**

(biosyntéza začíná od ceramidu až na laktosylceramid, který je prekurzorem globo-, ganglio-, lakto-, neolakto- muko a isoglobosérie)

## 1.6. Katabolismus sfingolipidů a glykosfingolipidů

Složení lipidních membrán je přísně regulováno a je vysoce specifické pro různé typy buněk a organel. Během endocytosy a zrání endosomů, pH lumen klesá a nastávají změny ve složení vnitřní membrány.

Katabolismus glykosfingolipidů je postupný proces odbourávání jednotlivých komponent GSL pomocí rozpustných hydrolytických enzymů, který probíhá převážně v lysosomech. GSL se z buněčných membrán dostávají do lysosomů endocytózou, fagocytózou nebo prostřednictvím receptory (LDL) zprostředkovanou endocytózou. Během endocytózy dochází k vychlípění plasmatické membrány za vzniku transportních váčků, které posléze fúzí s časnými endosomy a lysosomy, kde se pak vyskytují ve formě intralysosomálních vezikul. Lysosomální degradace GSL, zakotvených v membráně intralysosomálními vezikuly, začíná postupným odbouráváním sacharidových jednotek od neredukujícího konce sacharidového řetězce. V lumen lysosomu je udržováno kyselé pH pomocí protonové ATPasy umístěné v membráně, která čerpá  $H^+$  ionty dovnitř lysosomu. Výsledné katabolity jsou exportovány z lysosomů



pomocí transportních proteinů a mohou být opětovně využívány v buněčném metabolismu [10, 11].

Syntéza lysosomálních enzymů (glykoproteinů) probíhá na ribosomech drsného ER, odkud jsou transportovány do cis-Golgi, kde dochází k připojení manoso-6-fosfátových (M6P) značek. Tato značka odlišuje lysosomální enzymy od ostatních proteinů a slouží jako “adresa” do lysosomu. Jsou rozpoznávány M6P receptory v trans-Golgi, kde vzniká vázáním klathrinu na adaptiny transportní váček, který nakonec fúzuje s časným endosomem [12].

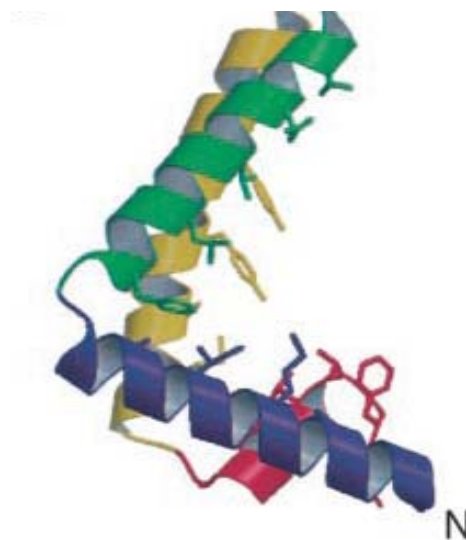
### 1.6.1. Degradace GSL s méně než čtyřmi sacharidovými jednotkami

GSL s méně než čtyřmi sacharidovými jednotkami jsou degradovány pouze v přítomnosti sfingolipidových proteinových aktivátorů. Mezi tyto aktivátory patří celkem pět malých neenzymových proteinů o molekulové hmotnosti 8 – 11 kDa: čtyři saposiny (SAP-A, -B, -C, -D) a GM2 aktivátor. Tyto proteiny zprostředkovávají interakce mezi membránově vázanými substráty a rozpustnými enzymy (SAP-B a GM2 aktivátor) nebo enzymy přímo aktivují (SAP-C).

Saposiny A – D vznikají z prekursoru prosaposinu proteolytickým štěpením na úrovni pozdních endosomů a lysosomů. Tyto saposiny mají značnou homologii, působí však odlišně a s jinou specifikou. Prosaposin je neenzymový glykoprotein o molekulové hmotnosti 70 kDa, kódovaný na chromosomu 10 q21-23 [10, 13].

Saponin B, známý jako cerebrosidsulfát-aktivátor, usnadňuje hydrolýzu sulfátové skupiny ze sulfatidu pomocí arylsulfatasy A a degradaci globotriaosylceramidu a digalaktosylceramidu v reakci katalyzované  $\alpha$ -galaktosidasou A.

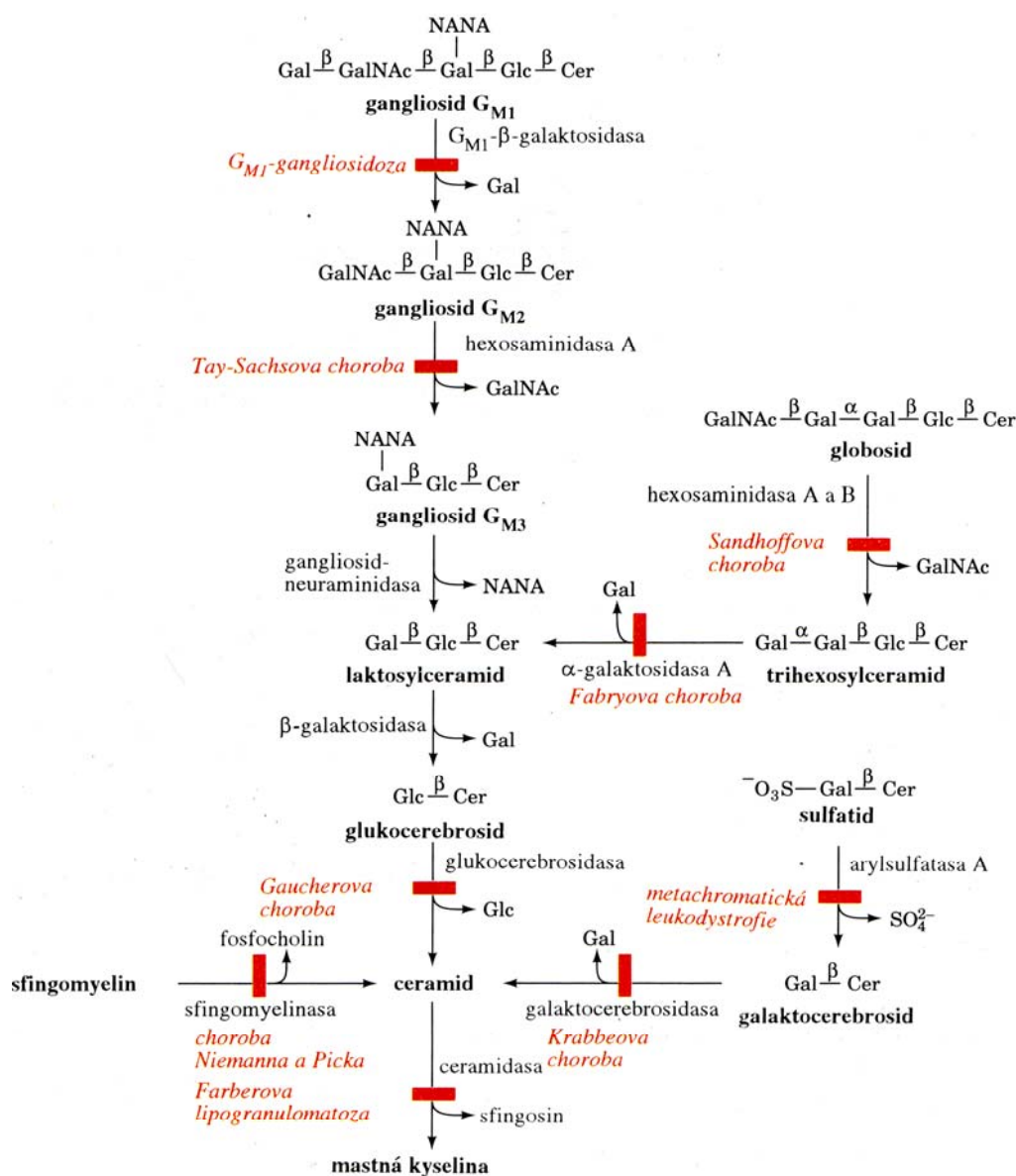
Jeho dimerní struktura je složena ze čtyř monomerů  $\alpha$ -helikálního uspořádání, ohnutých do tvaru V a uzavírajících velkou hydrofobní dutinu (Obr.4). Otevřená konformace saposinu B vyzdvihuje zanořené glykolipidy přímo z membrány, čímž se jednotlivé substráty stávají přístupnější pro daný enzym [14, 15].



**Obr.4.: Krystalografická struktura otevřené konformace lidského saposinu B. Převzato z [14]**

## 1.7. Dědičné poruchy katabolismu sfingolipidů - sfingolipidosy

Jsou to geneticky podmíněné defekty v důsledku poruchy funkcí enzymových nebo nekatalytických proteinů, zajišťujících funkčnost lysosomálního systému. V důsledku toho dochází k hromadění substrátových deposit v lysosomech a posléze k narušení základních buněčných funkcí. Základní schéma lysosomální degradace jednoduchých glykosfingolipidů zachycuje Obr.5 [11].



Obr.5: Schéma lysosomální degradace vybraných glykosfingolipidů a enzymů, které jednotlivé reakce GSL katalyzují . Převzato z [5]

### 1.7.1. Fabryho choroba – deficit aktivity $\alpha$ -galaktosidasy A

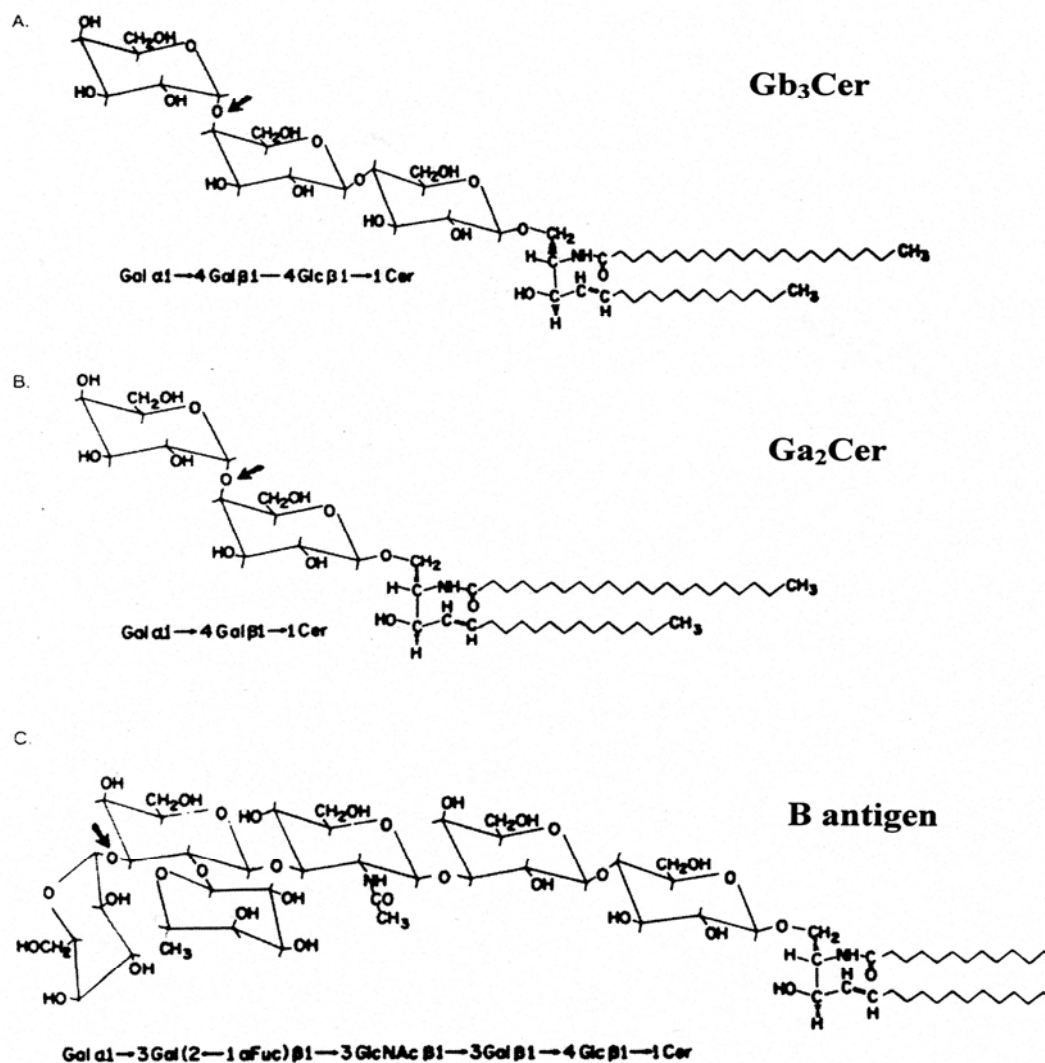
Fabryho choroba se řadí mezi sfingolipidosy (viz. str.17, Obr.5). Jde o X-vázané recesivní onemocnění, způsobené deficitem aktivity  $\alpha$ -galaktosidasy A ( $\alpha$ -GALA, E.C. 3.2.1.22) jejíž gen *GLA* je lokalizován na chromosomu X, v poloze Xq22.1. Kompletní sekvence *GLA* genu tvoří 12 kb obsahujících 7 exonů o délce 92 až 291 bp, zatímco délka intronových částí se pohybuje od 200 bp do 3,7 kb. Defekty v kódování *GLA* genu jsou ve většině případů primární mutace. Dosud bylo identifikováno 599 změn v sekvenci. Fenotyp jedinců se stejnou mutací v genu *GLA* se může lišit i v rámci jedné rodiny [16, 17].

Struktura lidské  $\alpha$ -GALA byla stanovena krystalograficky. Jedná se o homodimerní glykoprotein o celkové molekulové hmotnosti 110 kDa, kde každá monomerní jednotka obsahuje dvě terminální domény. N-terminální doménu tvoří klasický  $(\alpha/\beta)_8$  soudek a obsahuje aktivní místo enzymu. C-terminální doména je složena z 8 vláken tvořící antiparalelní  $\beta$ -strukturu sendvičového uspořádání.

Tento enzym je syntetizován jako prekurzorový protein, který podléhá celé řadě posttranslačních modifikací, včetně odštěpení pre-, pro-, peptidových fragmentů a N-glykosylaci převážně manosových oligosacharidových řetězců na volnou skupinu asparaginu [18].

U  $\alpha$ -GALA je dnes znám dvojí mechanismus účinku vyžadující přítomnost dvou karboxylových skupin, kde jedna slouží jako nukleofil a druhý jako kyselina. V prvním kroku dochází k nukleofilnímu ataku C-1 substrátu, rozštěpení glykosidické vazby a vytvoření komplexu enzym-substrát. V druhém kroku dochází k nukleofilnímu ataku molekulou vody na stejný uhlík substrátu vedoucí k rozštěpení kovalentní vazby mezi enzymem a ligandem za tvorby příslušného produktu [16].

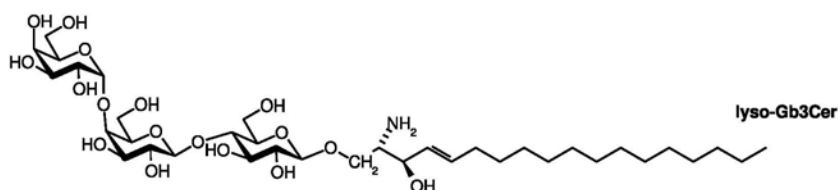
Přirozenými substráty tohoto enzymu jsou neutrální glykosfingolipidy s terminální  $\alpha$ -galaktosou, mezi které patří především globotriaosylceramid, dále galabiosylceramid a glykolipidy krevní skupiny B (viz. str.19, Obr.6)



**Obr.6: Struktura hlavních substrátů  $\alpha$ -galaktosidasy A [19]**

(šipkou je označeno místo štěpení terminální galaktosy)

U pacientů s Fabryho chorobou (FD) dochází k hromadění nedegradovaného globotriosylceramidu zejména v lysosomech cévního endotelu, v buňkách hladkého svalu cév a v epitelálních buňkách mnoha orgánů. Byla prokázána také zvýšená koncentrace jeho lyso-derivátu (Obr.7)



**Obr.7: Struktura lyso-Gb<sub>4</sub>Cer [19]**

U zdravých jedinců nalézáme Gb<sub>3</sub>Cer především v ledvině, aortě, slezině a v játrech. U pacientů – mužů s FD byla nalezena mnohonásobně zvýšená koncentrace tohoto substrátu ve všech uvedených orgánech, ale i v dalších tkáních s významným metabolickým obratem Gb<sub>3</sub>Cer (srdce). Lysosomální hromadění Gb<sub>3</sub>Cer se stupňuje s věkem, např. kolem 30 let věku bývá koncentrace tohoto lipidu až třistanásobně vyšší než v normálních tkáních [21].

V malé míře se u pacientů s FD ukládá také galabiosylceramid, který je tkáňově specifickým substrátem prokázaným v ledvině, pankreatu, srdci, plicním laloku, v močovém sedimentu a sympatických gangliích [21].

Mezi neodbourávané substráty patří také glykosfingolipidy krevní skupiny B, jejichž zvýšená koncentrace byla zjištěna u pacientů s FD s touto krevní skupinou. Dva hlavní glykolipidy s hexasacharidovým řetězcem s terminální  $\alpha$ -galaktosou, značené jako B-6-1 (laktosérie) a B-6-2 (neolaktosérie), byly prokázány zejména v žlázatých epiteliálních tkáních žaludku, střeva a pankreatu [22]. Z analýzy močového sedimentu pacientů s FD a kontrol vyplývá, že ke zvýšené exkreci glykolipidu B-6-1 a B-6-2 dochází více u pacientů, kteří jsou sekretory krevní skupiny B nebo AB [21, 23].

Mezi klinické příznaky u homozygotních mužů patří bolesti v končetinách, poruchy pocení, angiokeratomy a poruchy intolerance chladu a tepla. S rostoucím věkem pak dochází k závažnějším onemocněním, jako jsou renální a srdeční dysfunkce, neurologické komplikace či cerebrovaskulární onemocnění, které mohou vést až k úmrtí pacienta.

Klinické příznaky u žen heterozygotek FD jsou značně variabilní. Vzhledem k inaktivaci X chromosomu může klinický obraz svůj vážností odpovídat mužům s FD, ale postižení může být i mírnější nebo dokonce žádné. Variabilita u žen se projevuje i v jednotlivých orgánech, kde se mohou objevovat pouze některé příznaky onemocnění [21].

Předběžná diagnóza Fabryho choroby spočívá v posouzení klinických nálezů a symptomů u rodinných příslušníků. Definitivní diagnóza se provádí stanovením aktivity  $\alpha$ -GALA v plasmě nebo v buněčných homogenátech leukocytů, fibroblastů a buněk choria za použití syntetických fluorogenních substrátů (methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-galaktopyranosid). Nevýhodou je riziko negativně falešných výsledků u heterozygotních žen, proto je nezbytné doplnit analýzu zjištěním mutací v genu *GLA*. Doplnujícím stanovením může být průkaz neodbouraného metabolitu Gb<sub>3</sub>Cer v plasmě nebo v močovém sedimentu [21].

### **Podobnost $\alpha$ -galaktosidasy A s $\alpha$ -N-acetylgalaktosaminidasou**

$\alpha$ -GALA má značnou strukturní podobnost s  $\alpha$ -N-acetylgalaktosaminidasou, která byla dříve považována za  $\alpha$ -galaktosidasu B (isoenzym  $\alpha$ -GALA). Oba geny mají značnou homologii a předpokládá se, že vznikly duplikací ze společného genu během evoluce.

Pomocí izolované 3,6 kb dlouhé sekvence cDNA kódující  $\alpha$ -N-acetylgalaktosaminidasu bylo prokázáno, že existuje cca 50% homologie nukleotidů v cDNA kódující  $\alpha$ -GALA. Dále bylo prokázáno, že exony 2 – 7 v *NAGA* genu vykazují 46,2 – 62,7% totožnost s exony 1 – 6 v *GLA* genu [24].

### **1.7.2. Schindlerova choroba – deficit aktivity $\alpha$ -N-acetylgalaktosaminidasy**

Schindlerova choroba je autosomálně recesivní onemocnění způsobené deficitem aktivity  $\alpha$ -N-acetylgalaktosaminidasy ( $\alpha$ -NAGA, E.C. 3.2.1. 49). Gen kódující tento enzym je umístěn na chromosomu 22 q13.1.-13.2. Kompletní sekvenci genu tvoří 13,7 kb obsahujících 9 exonů o délce 95 – 2028 bp a intronové sekvence o délce 304 – 2648 bp.

Lidská  $\alpha$ -NAGA je homodimerní glykoprotein s molekulovou hmotností 90 – 117 kDa a s relativně termostabilní enzymovou aktivitou.

Přirozenými substráty tohoto enzymu jsou převážně glykoproteiny a v menší míře glykosfingolipidy krevní skupiny A s  $\alpha$ -N-acetylgalaktosaminovými zbytky.

Deficit aktivity  $\alpha$ -NAGA vede k jejich akumulaci v mnoha tkáních a tekutinách, kde jsou terminální  $\alpha$ -N-acetylgalaktosaminové zbytky vázány O- a N-glykosidickou vazbou.

Z klinického hlediska je tato choroba fenotypicky velice heterogenní – od těžké infantilní neurodegenerativní poruchy po velmi mírný typ s kožními lézemi a angiokeratomy [25].

Diagnostika Schindlerovy choroby se provádí stanovením aktivity  $\alpha$ -NAGA v plasmě nebo v buněčných homogenátech leukocytů a fibroblastů za použití syntetických fluorogenních substrátů (4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-N-acetylgalaktosamin). Doplnujícím stanovením může být analýza neodbouraných oligosacharidů a glykolipidů v plasmě.

### **1.7.3. Deficit prosaposinu a saposinu B**

Deficit prosaposinu je těžká komplexní sfingolipidosa, vyvolaná vzácnými mutacemi v iniciačním kodonu prosaposinového genu, která vede k úplné absenci prosaposinu a všech čtyř saposinů A – D. Tento deficit vede k masivnímu ukládání jednoduchých sfingolipidů v tkáních. Deficity jednotlivých aktivátorů připomínají fenotypicky odpovídající enzymový deficit (viz. str.17, Obr.5) [26].

## 1.8. Antigeny ABO(H) systému

V roce 1901 Karl Landstainer popsal první lidský antigenní systém krevních skupin ABO(H) na základě experimentu aglutinace červených krvinek v přítomnosti jiného séra. Landstainer spolu s dalšími kolegy objevil, že lidskou krev lze rozdělit do čtyř skupin podle přítomnosti dvou antigenů, A a B na povrchu červených krvinek a přítomnosti dvou odpovídajících protilátek anti-A a anti-B v plasmě (viz.Tab.2) [27].

**Tab.2: Krevní systém ABO [26]**

Krevní skupina	výskyt v EU (%)	Antigen na erythrocytech	Protilátka v plasmě
A	41.7	A	Anti-B
B	8.5	B	Anti-A
AB	3.0	A a B	-
0	46.7	-	Anti-A a anti-B

Antigenní vlastnosti erytrocytů, buněk tkání a sekretů jsou dány specifickými strukturami proteinů a oligosacharidů. Proteinové antigeny jsou přítomné na proteinech, glykoproteinech a proteinech s glykosylfosfatidylinositolovou kotvou erytrocytární membrány. Na rozdíl od nich jsou antigenní struktury oligosacharidů vázány O- nebo N-glykosidickou vazbou na proteiny (glykoproteiny) nebo sfingolipidy (glykolipidy), které nejsou vázány pouze na erytrocytární membránu, ale jsou také silně distribuovány v tělních tekutinách, v buňkách tkání a v nádorech [27, 28].

### 1.8.1. Genetika antigenů

Antigeny A a B jsou definovány trisacharidovými determinantami, které jsou kontrolovány třemi nezávislými genovými systémy:

- ABO gen - lokalizován na chromosomu 9 q34. Skládá se ze tří alel *A*, *B* a *O*. *A* a *B* alely kontrolují tvorbu A a B determinant a alela *O* je inaktivní a neprodukuje žádnou charakteristickou strukturu.
- Hh gen - lokalizován na chromosomu 19 q13.3. Produktem *H* genu je  $\alpha$ -1,2-fukosyltransferasa 1 (FUT1) a produktem *h* genu je inaktivní enzymový protein
- Se/se gen – lokalizován na chromosomu 19 q13.3. Produktem *Se* genu je  $\alpha$ -1,2-fukosyltransferasa 2 (FUT2) a produktem *se* genu je inaktivní enzymový protein

### 1.8.2. Biosyntéza antigenů

Základní strukturou antigenu H je prekurzorový řetězec, který se vyskytuje ve čtyřech typech (viz. Tab.3). První dva typy se liší vazbou mezi terminální galaktosou a jí předcházejícím N-acetylglukosaminem. Vazba  $\beta 1 \rightarrow 3$  se vyskytuje v řetězci typu I, který je přítomen v tkáních a tělních tekutinách. Vazba  $\beta 1 \rightarrow 4$  se vyskytuje v řetězci typu II, který je nejvíce zastoupen v systému ABO a je charakteristický pro GSL erytrocytární membrány z neolaktosérie. Řetězce typu III a IV se vyskytují pouze v nepatrném množství u krevní skupiny A [29, 30].

**Tab.3: Terminální disacharidové struktury prekurzorových řetězců I-IV [31]**

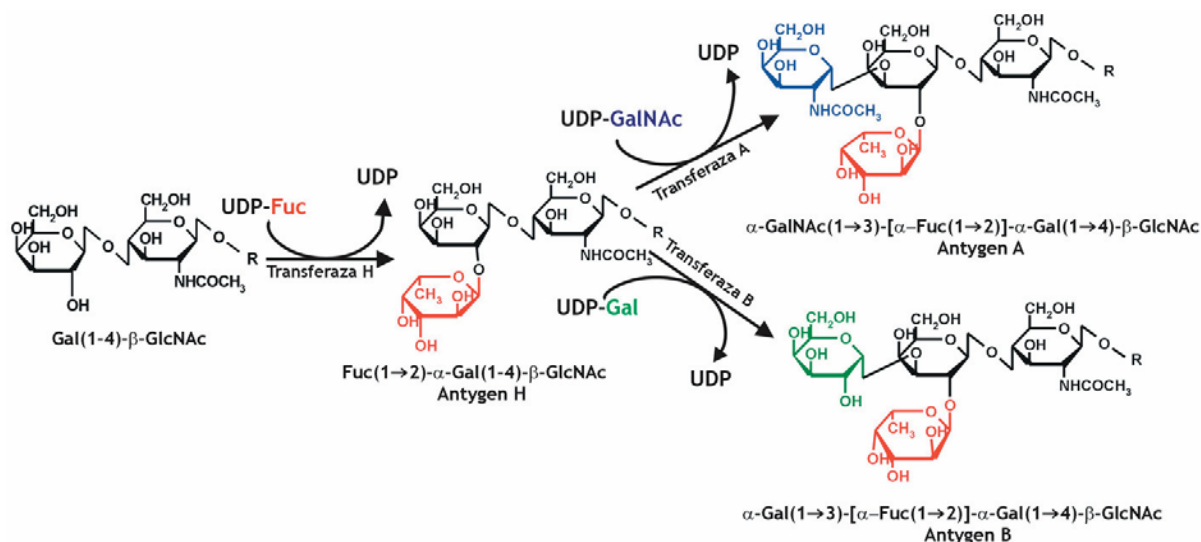
Typ prekurzorového řetězce	Terminální disacharidová struktura	Série GSL
Typ I	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{X}-$	Lakto-
Typ II	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{X}-$	Neolakto-
Typ III	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{X}-$	Repetitivní-
Typ IV	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow \text{X}-$	Globo-

(X značí příslušnost k dané sérii GSL)

Po připojení fukosy k prekurzorovému řetězci typu II, vzniká antigen H a tato reakce je katalyzována FUT 1 (produkt *H* genu) nebo FUT 2 (produkt *Se* genu), které se liší v kinetických vlastnostech a v afinitě k donorovým i akceptorovým substrátům.

Produktem genu *A* je  $\alpha$ -1,3-acetylgalaktosaminyltransferasa, která katalyzuje připojení N-acetylgalaktosaminu na H antigen za vzniku antigenu A. Produktem genu *B* je pak  $\alpha$ -1,3 galaktosyltransferasa, která katalyzuje připojení D-galaktosy na H antigen za vzniku antigenu B. Příklad biosyntézy A a B antigenu zachycuje Obr.8 (viz. str.24). Produkty genů jsou tedy enzymy schopné syntetizovat určitou cukernou strukturu, která posléze vyvolá protilátkovou odpověď [32].





**Obr.8: Příklad biosyntézy A a B antigenu z prekurzorového řetězce typu II [29]**

(biosyntéza začíná od prekurzorového řetězce typu II obsahující terminální β-galaktosu na antigen H, který je prekurzorem biosyntézy antigenů A a B, připojením N-acetylgalaktosaminu nebo D-galaktosy pomocí příslušných transferas)

Rozdělení jedinců podle schopnosti sekretovat solubilní antigeny krevních skupin systému ABO je řízena geny *Se/se* (dominantní a recesivní alelou). “Sekretoři” (ve střední Evropě cca 75%) mají genotyp *Se/Se* nebo *Se/se*, zatímco “non-sekretoři” mají genotyp *se/se*. Sekretorní gen také reguluje výskyt ABH aktivních glykolipidů v plasmě a ABH aktivních oligosacharidů v mléce a moči [28].

## 1.9. Metody analýzy glykosfingolipidů

### 1.9.1. Metody izolace a chromatografická separace GSL

Izolace a purifikace glykosfingolipidů je zaměřena k homogenitě sacharidové části a obvykle se skládá ze tří kroků:

- Extrakce glykolipidů z biologického materiálu organickými rozpouštědly (nejčastější směs chloroform – methanol – voda).
- Hrubé oddělení GSL od neutrálních lipidů, fosfolipidů a nelipidních příměsí (např. dialýza nízkomolekulárních látek, ionexová chromatografie neutrálních glykolipidů aj.). Celkové lipidy: 10% glykosfingolipidů, 60% fosfolipidů a 30% neutrálních lipidů.
- Chromatografická analýza pro dělení a purifikaci GSL.

### 1.9.2. Dělení GSL na tenké vrstvě (TLC) a kolonovou chromatografií (HPLC)

Tato metoda je často používaná k monitorování izolace a purifikace GSL, k jejich kvantitativnímu i kvalitativnímu stanovení z biologického materiálu a ke strukturní analýze v kombinaci např. s enzymy a biologickými aktivitami [33, 34]. Nejběžnější užívané detekce jsou:

- Chemické: destruktivní – orcinol, resorcinol a azur.
- Imunodetekce: nedestruktivní – pomocí protilátek.

HPLC analýza je velmi účinná metoda vhodná i ke kvantifikaci rozdělených lipidních složek, nevýhodou je však nutnost derivatizace volných aminoskupin sfingolipidů. Tato metoda využívá k separaci sfingoidních bází a lyso-glykosfingolipidů HPLC kolony s reverzní fází. Tato RP-HPLC používá chemicky vázanou nepolární stacionární fázi (nejčastěji typ C18), kde jsou molekuly vázány na částicích silikagelu. Jako mobilní fáze se používají polární organická rozpouštědla, nejčastěji směs methanol – voda (95:5, v/v/v) a chloroform – methanol – voda (65:35:8, v/v/v) [35].

### 1.9.3. Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemový hmotnostní spektrometr obsahuje dva hmotnostní analyzátory sériově spojené kolizní celou. V prvním analyzátoru (Q1) dojde k rozlišení prekurzorových (mateřských) iontů a k výběru jednoho z nich, který je charakteristický pro daný analyt ve směsi. Tento prekurzor je podroben fragmentaci v kolizní cele (Q2) srážkou s kolizním plynem (neutrální plyny jako N<sub>2</sub>, Ar, He apod.), kdy dochází ke kolizně indukované disociaci (CID) za vzniku dceřiných iontů. Tento proces je dán srážkou mateřského iontu s kolizním plynem, kdy dojde k předání kinetické energie mateřskému iontu. Takto předaná energie, jeli dostatečně vysoká, může vést k rozbití vazeb v mateřském iontu a vzniku jeho fragmentů. Dceřiné ionty jsou následně rozlišeny v druhém analyzátoru podle jejich hmotnosti [36, 37].

Ionizace elektrosprejem umožňuje vytvářet negativně či pozitivně nabitě ionty umožňující rozlišení sfingolipidů přímo z chloroform – methanolových extraktů. Jako ionizační medium pro GSL se používá 5 mM roztok NH<sub>4</sub>COOH v methanolu za tvorby [M+H]<sup>+</sup> iontu. Neutrální glykosfingolipidy (Ceramid, GlcCer, LacCer, Gb<sub>3</sub>Cer, Gb<sub>4</sub>Cer) po CID produkují specifické ionty, což umožňuje buď jejich kvalitativní analýzu skenováním prekurzorových iontů nebo jejich kvantifikaci zejména pomocí monitorování více reakcí (MRM). Tento iont je tvořen

štěpením molekuly ceramidu za vzniku sfingoidní báze a po další ztrátě molekuly vody vzniká dceřiný iont o  $m/z$  282, který je dominantní pro lyso-SFL. Po ztrátě dvou molekul vody vzniká finální (dceřiný) iont o  $m/z$  264, používaný pro sledování SFL. Sfingomyelin produkuje po CID jako finální iont fosfocholin s  $m/z$  184 [38, 39].

## 2. Cíle práce

Práce navazuje na předchozí studie laboratoře a jejím záměrem je přispět k objasnění některých specifit katabolické dráhy lipidních substrátů  $\alpha$ -GALA, které se hromadí v buňkách pacientů s FD. V tomto modelovém systému budeme zejména sledovat osud antigenů krevní skupiny B, které mohou představovat vedle kritického lipidu Gb<sub>3</sub>Cer další substrátovou zátěž u pacientů s touto krevní skupinou.

- **Analýza glykolipidů krevních skupin B v pankreatu a plicní tkáni pacientů s Fabryho nemocí (FD) a u kontrol.**
- **Příprava a provedení metabolických experimentů v buněčných kulturách s cílem zjistit možnou účast  $\alpha$ -NAGA na odbourávání GSL krevní skupiny B v buňkách s deficitem  $\alpha$ -GALA:**
  1. Stanovit aktivitu  $\alpha$ -GALA a  $\alpha$ -NAGA v mutantních a kontrolních kultivovaných kožních fibroblastech.
  2. Provést v těchto buňkách analýzu glykosfingolipidů chromatograficky a tandemovou hmotnostní spektrometrií.
  3. Připravit glykolipid krevní skupiny B (B-6-2) pro značení triciem v ceramidové části: k tomu využít surové preparáty glykosfingolipidů erytrocytární membrány z předchozích izolací
  4. Provést zátěžové experimenty s [<sup>3</sup>H]B-6-2 glykolipidem v kulturách fibroblastů s poruchou funkce  $\alpha$ -galaktosidasy A a kontrolních fibroblastů.
  5. Připravit Gb<sub>4</sub>Cer s neradioaktivní hmotnostní značkou a nahradit tak v metabolických experimentech dosud užívaný substrát značený radioisotopem.

## 3. Materiál a metody

### 3.1. *Materiál*

#### 3.1.1 Chemikálie a další použitý materiál

4-chlor-1-naftol (Sigma, U.S.A.)

4-methylumbelliferon- $\beta$ -D-galaktopyranosid (Sigma, Saint Louis, U.S.A.)

4-methylumbelliferon (Calbiochem, San Diego, U.S.A.)

7,5 % NaHCO<sub>3</sub> (Biochrom AG, Německo)

Aceton (Penta, ČR)

Antibiotikum Penicilin/Streptomycin (Biochrom AG, Německo)

Antibody Duluent with Background Reducing Components (DakoCytomation, U.S.A.)

BSA – hovězí sérový albumin (Sigma, Německo)

Cyklohexan (Sigma, Německo)

CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (Sigma, USA)

DAB+ Chromogen, 3,3'-diaminobenzidin (DakoCytomation)

DAB+ Substrate buffer, imidazol-HCl pufr, pH 7,5 (DakoCytomation)

DC – Alufolien Kieselgel 60 (Merk AG, Německo)

Dimethylsulfoxid (Sigma, U.S.A.)

DMEM medium (Gibco, Německo)

Ethanol (P – lab, ČR)

Folin-Ciocalteu činidlo (Sigma, U.S.A.)

Fetální telecí sérum (Gibco, Německo)

Glycerol (Lachema, ČR)

HPTLC – Fertigplatten, Kieselgel 60 (Merck, Germany)

Hematoxylin Harris (lékárna Hradec Králové – Říčany)

Chloroform (Sigma, U.S.A., HPLC čistota)

Kyselina sírová (Lachema, ČR)

L-Alanin-L-Glutamin (Biochrom AG, Německo)

Methanol (Sigma, ČR, LC-MS čistota)

Mravenčan sodný (Fluka, U.S.A)

NaOH (Lachema, ČR, MS čistota)

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Lachema, ČR)

Nonadekanová kyselina: C19:0, (Matreya, LLC., U.S.A.)  
 N-acetylgalaktosamin (Sigma, U.S.A.)  
 Orcinol (Sigma, U.S.A.)  
 Polyethylenglykol-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)fenyl ether – Triton X-100 (Sigma, U.S.A.)  
 Polygram Sil-G (Macherey & Nagel, Německo)  
 Polyoxyethylenesorbitan monolaurate – Tween 20 (Sigma, U.S.A.)  
 Polyvinyl-pyrrolidon (Sigma, USA)  
 Primární protilátka: Diagnostikum anti-A (anti-B) monoklonální (Exbio, ČR)  
 Primární protilátka: Monoclonal antibody to Blood Group A (B), mouse IgM (Exbio, ČR)  
 Primulin (Sigma, U.S.A.)  
 Pyruvát sodný (Biochrom AG, Německo)  
 Sphingolipid ceramid N- deacylasa (Takara Bio Inc., Japonsko)  
 Sekundární protilátka: EnVision+ Systém Labbelled Polymer – HRP, anti-mouse (DakoCytomation, U.S.A.)  
 Sekundární protilátka: kozí anti-mouse IgM/Px – značená peroxidasou (Pierce, ČR)  
 Solacryl BMX (Penta, ČR)  
 Telecí sérum (Biochrom AG, Německo)  
 Trypsin (Gibco, Německo)  
 Vinan sodno-draselný tetrahydrát:  $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$  (Sigma, Německo)  
 Xylen (Penta, ČR)  
 Vaječný albumin (Roth, Německo)

Všechny uvedené chemikálie měly p.a. čistotu.

Všechna organická rozpouštědla byla před použitím predestilována.

### 3.1.2 Biologický materiál

Kultury kontrolních i mutantních kožních fibroblastů používané v této práci pochází z archivu buněk uložených v tkáňové bance Ústavu dědičných metabolických poruch. Všechny použité linie jsou od anonymních dárců a pacientů.

Vzorky tkání pochází z tkáňového archivu tohoto ústavu a jsou rovněž anonymní.

### **3.2. Přístroje**

Denzitometr CAMAG II (Mettler, Switzerland)

Termostat Reacti Therm (Pierce, ČR)

Luminiscenční spektrometr Perkin Elmer LS50B (Wellesley, U.S.A.)

UV – VIS spektrofotometr (UV – 2550, Shimadzu, Japonsko)

Centrifuga Jouan BR 4i (Trigon – plus, ČR)

Mikrocentrifuga Roth (P – lab, ČR)

Centrifuga universal 32R (Hettich, Německo)

Míchačka Multi Bio RS-24 (Biotech, ČR)

Kapalinový HPLC chromatograf UV/VIS 151 (Gilson, Francie)

HPLC kolona 15cm x 3mm (Supelco analytical, U.S.A.)

Sběrač frakcí FC 203B (Gilson, U.S.A.)

Inkubátor BE 300 (Memert, Německo)

CO<sub>2</sub> Inkubátor IGO 150 (Jouan, Francie)

Třepačka KM-2 (Edmund Bühler, Německo)

pH metr HI 9024 (Hanna instruments, U.S.A.)

Sonikátor Ultrasonic Processor (Cole – Parmer, U.S.A.)

Homogenizátor Ultrasonic Homogenizer 4710 (Cole – Parmer, U.S.A.)

Sonikátor Sonorex TK 30 (Bandelin, Německo)

Vortex Gene 2 (Biotech, ČR)

Lyofilizační zařízení Chris L1 (B. Braun Biotech international, Německo)

Mikroskop eclipse TS 100 (Nikon, Japan)

Laminární box Clean Air CA/RE3 (The Netherlands)

Elektrický homogenizátor Micra D-9 (ART Prozess- & Labortechnik GmbH & Co, Německo)

Lineární scanner TLC analyzer V2.05 (Raytest, Německo)

### 3.3. Metody

#### 3.3.1. Analýza glykolipidů krevní skupiny B v pankreatu a plicní tkáni pacientů s Fabryho chorobou

##### 3.3.1.1. Extrakce celkových lipidů ze vzorků tkání pankreatu a plic

Vzorky tkání fixované ve formolu byly promyty vodou a poté homogenizovány v pětinasobném objemu vody pomocí elektrického homogenizátoru (Micra D-7, Německo). Z homogenátu bylo odebráno 200  $\mu$ l pro stanovení proteinu a zbývající homogenát byl zmražen pomocí kapalného dusíku a lyofilizován. Lyofilizované vzorky byly extrahovány přes noc směsí chloroform – methanol – voda (20:10:1, v/v/v), zcentrifugovány (centrifuga Jouan BR 4i, ČR) při 300g a supernatanty přefiltrovány do čistých zkumavek. Peleta byla reextrahována stejným způsobem směsí chloroform – methanol - voda (10:20:1, v/v/v) a reextrakční krok byl ještě jednou zopakován ve směsi chloroform – methanol (1:1, v/v). Spojené lipidní extrakty byly odpařeny pod proudem dusíku při 45°C a rozpuštěny na pracovní koncentraci 1 mg vlhké tkáně/2  $\mu$ l chloroform – methanol (1:1, v/v).

##### 3.3.1.2. Stanovení proteinu v tkáňových homogenátech

Stanovení proteinu bylo provedeno spektrofotometrickou metodou, modifikovanou dle Lowryho [40].

Pro stanovení proteinu bylo z tkáňových homogenátů odebráno 25  $\mu$ l, které byly naředěny přidáním 25  $\mu$ l miliQ vody. Z takto zředěného homogenátu bylo odebráno 5  $\mu$ l pro stanovení proteinu, ke kterým bylo přidáno 195  $\mu$ l miliQ vody. Kalibrační řada koncentrací byla připravena ze zásobního roztoku BSA (0,1 mg/ml; viz. Tab.4).

**Tab.4: Kalibrační řada BSA (zásobní roztok 0,1 mg/ml )**

Koncentrace BSA [ $\mu$ g]	0	5	10	15	20
Zásobní roztok BSA [ $\mu$ l]	0	50	100	150	200
H <sub>2</sub> O [ $\mu$ l]	200	150	100	50	0

Ke všem analyzovaným vzorkům i vzorkům kalibrační řady bylo přidáno 200  $\mu$ l roztoku A (viz. str.32, Tab.5). Zkumavky byly promíchány na Vortexu a inkubovány 10 minut při 50°C. Po ochlazení vzorků na laboratorní teplotu bylo přidáno 20  $\mu$ l roztoku B (viz. str.32, Tab.6),



zkumavky byly promíchány a inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě. Nakonec bylo přidáno 600 µl roztoku C (viz. str.32, Tab.7), všechny vzorky byly promíchány a inkubovány 10 minut při 50°C. Po ochlazení vzorků na laboratorní teplotu byla absorbance kalibrační řady a vzorků měřena při 650 nm na UV – VIS spektrofotometru.

**Tab.5: Složení zásobního roztoku A**

Chemikálie	Množství
C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNaO <sub>6</sub> .4H <sub>2</sub> O	2 g
Bezvodý Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	90 g
1 M NaOH	450 ml
miliQ voda	doplnit do 1000 ml

**Tab.6: Složení zásobního roztoku B**

Chemikálie	Množství
C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNaO <sub>6</sub> .4H <sub>2</sub> O	2 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1 g
1 M NaOH	10 ml
miliQ voda	doplnit do 100 ml

**Tab.7: Složení zásobního roztoku C**

Chemikálie	Množství
Folin-Ciocalteu činidlo	1 ml
miliQ voda	14 ml

### **3.3.1.3. Analýza glykosfingolipidů tenkovrstvou chromatografií na HPTLC silikagelových vrstvách**

Celková neutrální frakce glykosfingolipidů včetně glykolipidů krevní skupiny A a B byla analyzována chromatograficky na HPTLC silikagelové desce (DC – Alufolien Kieselgel 60 nebo skleněné Fertigplatten, Kieselgel 60) a nebo na silikagelové plastové fólii (Polygram Sil G). Glykolipidy byly rozpuštěny ve směsi chloroform – methanol (2:1, v/v) a příslušné alikvoty nanесeny na start v 0,5 cm čárce 1,5 cm od dolního okraje. Chromatogram byl vyvíjen v soustavě chloroform – methanol – voda (65:35:8, v/v/v) ve vysycené chromatografické komoře.

### **Chemická detekce glykosfingolipidů orcinolem**

Orcinolové činidlo bylo připraveno rozpuštěním 1,25 g orcinolu (3,5-dihydroxytoluen) v 50 ml ethanolu, roztok byl přidán k 27,8 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 100 ml ethanolu v odměrné baňce a objem doplněn do 250 ml ethanolu. Chromatogram byl postříkán pomocí automatického rozprašovače a zahříván při 110°C cca 5 minut až do fialového zbarvení sacharidových struktur glykosfingolipidů [41, 42].

### **Imunodetekce glykolipidů krevních skupin A a B pomocí specifických primárních protilátek**

Chromatogram s rozdělenými glykosfingolipidy byl nejprve vložen do blokovacího pufru {1% polyvinylpyrolidon (PVP) a 1% albumin v PBS (Phosphate Buffered Saline pufru, Tab.8} na dobu 1 hodiny při 37°C. Následně byl inkubován v primární protilátce {diagnostikum anti-A nebo B, myší, monoklonální} zředěné v poměru 1:5 ředícím pufrem (3% PVP v PBS) při 8°C přes noc za mírného míchání na třepačce. Druhý den byla destička promyta 6x 5 minut promývacím pufrem {0,1% TWEEN v PBS pufru} a následně inkubována v sekundární protilátce značené peroxidasou {koží anti myší IgM/Px}, zředěná v poměru 1:200 s ředícím pufrem po dobu 1 hodiny při 37°C.

Po inkubaci byla destička promyta 6x 5 minut promývacím pufrem. Imunoaktivní glykolipidy byly vizualizovány enzymovou reakcí peroxidasy s chromogenním substrátem 4-chlor-naftolem. Roztok substrátu byl připraven rozpuštěním 6 mg 4-chlor-4-naftolu ve 2 ml methanolu, smíchán s 10 ml 50 mM Tris-HCl pufrem o pH 7,4 a těsně před použitím bylo k roztoku přidáno 5 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Roztok byl nalit do nádoby s promytým chromatogramem. Průběh reakce byl sledován vizuálně za mírného třepání na třepačce a přibližně po 5 minutách byla reakce ukončena přidáním vody. Nakonec byl chromatogram promyt a ponechán zaschnout. Imunopositivní glykolipidy byly zbarveny šedofialově na bílém pozadí [43].

**Tab.8: Složení 10x koncentrovaného zásobního pufru PBS, pH 7,2**

<b>Chemikálie</b>	<b>Množství</b>
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	2,89 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
miliQ H <sub>2</sub> O	doplnit do 1 l

#### **3.3.1.4. Denzitometrické vyhodnocení chromatogramů po imunodetekci**

Na chromatogramy, které byly semikvantitativně vyhodnocovány, byla kromě analyzovaných vzorků nanášena kalibrační řada standardu B-6-2 glykolipidu (0,2; 0,4; 0,8; 1,2 a 1,6 pmol). Jako kalibrační roztok byl pro denzitometrické měření použit zásobní roztok B-6-2 glykolipidu o koncentraci 2 pmol/10 µl chloroform – methanol (1:1, v/v).

Intenzita zbarvení byla vyhodnocována na denzitometru CAMAG II při 540 nm v odraženém světle a koncentrace imunopozitivních glykolipidů byla odečtena z kalibrační křivky.

#### **3.3.1.5. Kvantitativní analýza neutrálních GSL tandemovou hmotnostní spektrometrií (ESI-MS/MS)**

Pro tandemovou hmotnostní spektrometrii byl u pankreatu použit alikvot extraktu odpovídající 180 µg (kontrola) nebo 90 µg (pacient) proteinu, u plicní tkáně alikvot odpovídající 120 µg (kontrola) a 60 µg (pacient) proteinu. Extrakty byly odpařeny v proudu dusíku při 45°C a rozpuštěny ve 400 µl 5 mM roztoku  $\text{NH}_4\text{COOH}$  v methanolu (3,2 mg  $\text{NH}_4\text{COOH}$  v 10 ml methanolu). Vzorky byly intenzivně promíchány na Vortexu a sonikovány (Sonorex TK 30, Německo) po dobu 5 minut. Vzorky byly aplikovány do hmotnostního spektrometru pomocí autosampleru. Následně byla provedena elektrosprejová ionizace spolu s tandemovou hmotnostní analýzou metodou injekce 20 µl vzorku do toku mobilní fáze bez HPLC separace (FIA-ESI-MS/MS). Použitá mobilní fáze byl methanol o průtoku 50 µl/min. SFL byly měřeny v pozitivním módu metodou monitorování více reakcí. Byly měřeny dceřiné ionty  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , které svým m/z odpovídaly lipidům se spektrem mastných kyselin v ceramidu od C16 do C26 včetně hydroxylovaných forem. Produktový iont byl ion s m/z 264,4. Pro lyso-Gb<sub>3</sub>Cer byl jako dceřiný iont použit iont s m/z 282.

#### **3.3.1.6. Imunohistochemická analýza antigenů krevních skupin v parařinových řezech pankreatů**

Parařinové řezy pankreatů o síle 4 – 5 µm byly připraveny v histochemické laboratoři ÚDMP (paní Marie Kolářová).

Parařinové řezy na mikroskopických sklíčkách byly nejprve promyty řadou rozpouštědel a destilované vody {xylen (5min.), xylene (5min.), xylene (5 min.), aceton (2 min.), aceton (2 min.), ethanol (2 min.), destilovaná voda (2 min.), destilovaná voda (2 min.)}, aby došlo k odstranění parařinu. Poté byla endogenní peroxidasa zablokována působením roztoku azidu sodného {0,05 g azidu sodného bylo rozpuštěno v 50 ml miliQ vodě a těsně před použitím

přidáno 5 ml 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  ) po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. V dalším kroku byla přímo na řezy aplikována primární protilátka {Monoclonal antibody to Blood Group A (B), mouse IgM }, ředěná v poměru 1:25 proteinovým blokovacím roztokem (Antibody diluent with Background Reducing Components). Sklíčka s navrstvenou primární protilátkou byla inkubována v lednici přes noc a druhý den byla promyta 4x 5 minut roztokem PBS při mírném míchání na třepačce. Na promyté řezy byla aplikována 1 kapka sekundární protilátky (En Vision+ Systém Labeled Polymer – HRP, anti-mouse) a sklíčka byla inkubována 1 hodinu v inkubátoru (Inkubátor BE 300, Německo) při 37 °C . Po uplynutí této doby, byla sklíčka s řezy promyta roztokem PBS 4x 5 minut. Imunoaktivní glykokonjugáty (glykoproteiny) byly vizualizovány enzymovou reakcí exogenní peroxidasy se substrátem 3,3'-diaminobenzidinem {1 kapka DAB+ Chromogen v 1 ml DAB+ substrate buffer (imidazol-HCl pufr, pH 7,5)}. Nakonec bylo provedeno barvení jader hematoxylinem, odvodnění sklíček odvodňovací řadou rozpouštědel {ethanol (1 min.), ethanol (1 min.), aceton (1 min.), aceton-xylen (1:1, 1 min.), xylen (1 min.)} a montování řezů pankreatů do solakrylu BMX.

### **3.3.2. Zátěžové experimenty v buněčných kulturách**

#### **3.3.2.1. Příprava glykosfingolipidu B-6-2 značeného tritiem**

Metodami izolace GSL z lidské erytrocytární membrány se zabýval RNDr. Robert Dobrovolný ve své diplomové práci [19], kdy připravil řadu produktů s různým stupněm čistoty, z nichž část zůstala ještě nezpracována. Protože bylo nutné připravit čistý B-6-2 glykolipid pro další metabolické studie, navázala jsem na jeho práci a zabývala se analýzou těchto izolovaných GSL frakcí pomocí chromatografických metod na tenké vrstvě silikagelu. Metody jsou popsány v oddílu 3.3.1.3. Vybrané preparáty čistých B-6-2 glykosfingolipidů byly poté použity k radioaktivnímu značení na základě redukce dvojných vazeb v ceramidové části GSL pomocí tritia. Značení provedl Dr. B. Černý, CSc. z Ústavu nukleární medicíny 1.LF UK [44].

#### **3.3.2.2. Pěstování kultur lidských kožních fibroblastů a příprava buněčného homogenátu**

Kultury lidských kožních fibroblastů (viz. kap. 3.1.2.) byly pěstovány v prostředí media DMEM (Dulbecco's Minimum Essentials Medium, viz. str.36, Tab.9) obsahující 10% telecího séra v 25 cm<sup>2</sup> kultivačních lahvích v inkubátoru (CO<sub>2</sub> Inkubátor IGO 150, Francie) při 37°C a s 5% obsahem CO<sub>2</sub>. Konfluentní buňky byly sklizeny buď uvolněním buněk ze dna nádob pomocí trypsinu (1 ml 10x koncentrovaný trypsin v 9 ml PBS pufru) nebo byly po promytí

roztokem PBS “seškrábány“ pomocí plastové škrabky. Buněčná suspenze byla zcentrifugována při 300g (5°C, 10 min.), medium odsáto pipetou a pelety buněk byly buď ihned zpracovány nebo uchovány v mikrozkuvkách při -20°C [44, 45].

K buněčným peletám bylo v mikrozkuvkách přidáno 250  $\mu$ l miliQ vody a buňky byly homogenizovány promícháním a sonikací v ultrasonikátoru (Ultrasonic Procesor, U.S.A.) 3x 10 sekund. Z takto připravených buněčných homogenátů byl odebrán 50  $\mu$ l alikvot na stanovení proteinu a enzymových aktivit. Zbýlých 200  $\mu$ l homogenátů bylo použito na extrakci lipidů dle Folche.

**Tab.9: Příprava DMEM media**

Chemikálie	Množství
7,5 % NaHCO <sub>3</sub>	10 ml
100 mM pyruvát sodný	5 ml
200 mM L-Alanin-L-Glutamin	10 ml
Penicilin/Streptomycin	5 ml
DMEM medium	doplnit do 500 ml

Ke 400 ml DMEM media v zásobní lahvi bylo přidáno: 10 ml 7,5% NaHCO<sub>3</sub>, 5 ml 100 mM pyruvát sodný, 10 ml 200 mM L-Alanin-L-Glutamin a 5 ml Penicilin/Streptomycin. Zásobní láhev byla doplněna do 500 ml DMEM mediem. Nakonec bylo přidáno 10% telecího séra

### 3.3.2.3. Stanovení proteinu

Stanovení proteinu bylo provedeno obdobně jako u tkáňových homogenátů s modifikací, že z 50  $\mu$ l homogenátů fibroblastů bylo odebráno 5  $\mu$ l pro stanovení proteinu. Další postup byl zcela shodný s postupem v odstavci 3.3.1.2.

### 3.3.2.4. Stanovení aktivity $\alpha$ -galaktosidasy A v homogenátech kožních fibroblastů

Ke stanovení aktivity  $\alpha$ -GALA se běžně používá syntetický fluorogenní substrát 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-galaktopyranosid (MU- $\alpha$ -Gal).  $\alpha$ -GALA katalyzuje hydrolytickou reakci, při které vzniká D-galaktosa a 4-methylumbelliferon, jehož koncentrace se stanovuje fluorometricky.

Postup byl následující: Reakce byla spuštěna smícháním 10  $\mu$ g proteinu ve 20  $\mu$ l homogenátu fibroblastů s 20  $\mu$ l roztoku substrátu (5 mM MU- $\alpha$ -Gal). Blank byl připraven smícháním 20  $\mu$ l

vody s 20 µl substrátu. Reakce probíhala 30 minut v inkubátoru při 37°C a poté byla ukončena přidáním 0,6 ml stopovacího glycinového pufru pH 10,6. Fluorescence uvolněného 4-methylembelliferonu (4-MU) a kalibrační řada byla změřena při 365/448 nm (ex/em) na luminiscenčním spektrometru. Pro přípravu kalibrační řady koncentrací 4-MU byl použit zásobní roztok 1 µM 4-MU v glycinovém pufru, jak je uvedeno v Tab.10 [46].

**Tab.10: Kalibrační křivka 4-MU**

c (nmol/ml)	0	0,2	0,4	0,6
1 µM (µl)	0	240	240	360
0,2 M glycin/NaOH (µl)	600	960	360	240

Stejným způsobem, vedle α-GALA, byl měřen i kontrolní enzym β-galaktosidasa (β-GAL) jen s tím rozdílem, že reakce byla spuštěna smícháním 5 µg proteinu ve 20 µl homogenátu fibroblastů s 20 µl roztoku substrátu (2 mM MU-β-galaktosid).

Specifická aktivita enzymů byla vyjádřena v nmol 4-MU uvolněného ze substrátu 1 mg fibroblastových proteinů za 1 hodinu.

Vzorec pro výpočet aktivity v homogenátech fibroblastů:

$$A = \frac{(c_{vz} - c_{bl}) \cdot V}{m \cdot \tau} \text{ [nmol.mg}^{-1}.\text{hod}^{-1}]$$

$c_{vz}$  – koncentrace 4-MU ve vzorku [µM]

$c_{bl}$  – koncentrace 4-MU v blanku v [µM]

V – konečný reakční objem po zastavení reakce [ml]

$\tau$  – reakční čas [hod.]

m – celkový protein v reakci [mg]

#### ***Roztok substrátu pro fibroblasty: 5 mM MU-α-Gal***

1,69 mg MU-α-Gal bylo rozpuštěno v 1 ml reakčního pufru (109,1 ml 0,1 M kyseliny citronové bylo smícháno s 90,9 ml 0,2 M fosforečnanem sodným, pH 4,5) Nakonec byl přidán 0,2 M N-acetyl-D-galaktosamin (GalNAc; 44,24 mg na 1 ml reakčního pufru), potřebný pro inhibici α-NAGA.

#### ***Stopovací glycinový pufr: 0,2 M glycin/NaOH pufru, pH 10,6***

15,01 g glycinu bylo rozpuštěno v cca 800 ml miliQ vody, pH roztoku bylo upraveno 2 M NaOH na pH 10,6 a roztok byl doplněn v odměrné baňce do 1000 ml miliQ vodou.

### **3.3.2.5. Extrakce buněčných homogenátů v modifikaci dle Folche [47]**

Ke 200 µl homogenátům fibroblastů bylo přidáno 800 µl směsi chloroform – methanol (2:1, v/v). Vzorky byly promíchány a zcentrifugovány (centrifuga Jouan BR 4i, ČR) při 300g. Po centrifugaci vzorků se utvořil dvoufázový systém s vysráženým proteinem v mezifázi. Horní a dolní fáze byla odebrána do čistých zkumavek, zatímco proteinový prstenec zůstal nalepen na stěně zkumavky a byl reextrahován dalšími 4 díly směsi chloroform – methanol (2:1, v/v). Po 30 minutách při laboratorní teplotě byly lipidní extrakty spojeny a odpařeny v termostatu v proudě dusíku při 45°C.

### **3.3.2.6. Chromatografická analýza glykosfingolipidů v buněčných homogenátech fibroblastů**

Celková frakce glykosfingolipidů byla analyzována tenkovrstvou chromatografií (HPTLC – Fertigplatten, Kieselgel 60). Odparek lipidů byl rozpuštěn na konečnou koncentraci odpovídající 10 µg proteinu/1 µl směsi chloroform – methanol (2:1, v/v). Na destičku bylo aplikován alikvot 200 µg proteinu 1,5 cm od dolního okraje na 5 mm start a chromatografie proběhla v parami vysycené chromatografické komoře ve směsi chloroform – methanol – voda (65:35:8, v/v/v) při laboratorní teplotě.

Detekce byla provedena orcinolovým činidlem, jak uvedeno v kapitole 3.3.1.3.

### **3.3.2.7. Kvantitativní analýza neutrálních GSL tandemovou hmotnostní spektrometrií**

Pro analýzu tandemovou hmotnostní spektrometrií byl vždy odebrán alikvot buněčného extraktu odpovídající 50 µg proteinu. Extrakty byly odebrány pomocí mikrostříkačky Hamilton a přefiltrovány přes 0,45 µm PTFE filtr. Pro vlastní měření byl ze vzorku odebrán alikvot 10 µg proteinu a další postup přípravy byl shodný s postupem popsáným v kapitole 3.3.1.5.

### **3.3.2.8. Zátěžové experimenty v buněčných kulturách fibroblastů a analýza vzorků**

#### **Příprava substrátu**

Zásobní roztok substrátu [<sup>3</sup>H]Dihydro-B-6-2 glykolipidu o radioaktivitě 26 MBq/5 ml směsi chloroform – methanol (1:1, v/v) byl připraven u Dr. B. Černého (viz. kapitola 3.3.2.1.). Ze zásobního roztoku substrátu bylo odebráno požadované množství směsi (0,166 MBq/1 kultivační láhev) do mikrozkuavky. Po odpaření rozpouštědla pod proudem dusíku

v termostatu při 45°C byla mikrozkušavka se vzorkem vložena do exikátoru, dále byla sterilizována přidavkem malého objemu směsi chloroform – methanol (2:1, v/v) a pomocí vakua odpařena do sucha. Exikátor byl následně přenesen do laminárního boxu, kde byl otevřen. Ke vzorku bylo přidáno 200 µl dimethylsulfoxidu, mikrozkušavka byla uzavřena parafilmem a poté sonikována 10 minut při 60% výkonu sonikátoru (Ultrasonic Homogenizer 4710, U.S.A.). V laminárním boxu byla zkumavka otevřena a za intenzivního míchání na Vortexu byl přidán substrát (0,166 MBq/1 kultivační láhev) k požadovanému množství předem připraveného DMEM media s 1% telecího séra. (3 ml media/1 láhev). Nakonec byl přidán 500 µM conduritol B-epoxid jako inhibitor β-glukocerebrosidasy (24 µl 10 mg/ml zásobního roztoku CBE/1 kultivační láhev). Takto připravené medium bylo přidáno k napěstovaným buněčným kulturám fibroblastů (viz. kap. 3.3.2.2.) kontrolních buněk, buněk s deficitem α-GALA, s deficitem α-NAGA, s prosaposinovým deficitem a deficitem saposinu B. Buňky byly inkubovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru (Inkubátor IGO 150, Francie) při 37°C a 5% obsahu CO<sub>2</sub> po dobu 5 dnů a poté sklizeny uvolněním ze dna lahví 2 ml trypsinu v PBS pufru (1 ml 10x koncentrovaný trypsin v 9 ml PBS pufru). Buněčná suspenze byla zcentrifugována při 300g (5°C, 10 min.), medium odsáto pipetou a pelety buněk byly buď ihned zpracovány nebo uchovány v mikrozkušavkách při -20°C.

### **Analýza vzorků**

Sklizené pelety lidských fibroblastů byly homogenizovány ve 250 µl miliQ vody (viz. kap. 3.3.2.2.). 50 µl homogenátu bylo odebráno pro stanovení proteinu ve vzorku (viz. kap. 3.3.1.2.) a zbylých 200 µl homogenátu bylo použito na extrakci dle Folche (viz. kap. 3.3.2.5.).

Celková frakce glykosfingolipidů byla analyzována tenkovrstvou chromatografií (TLC – Fertigplatten, Kieselgel 60, 20x 20 cm). Odparek lipidů byl rozpuštěn v 50 µl chloroform – methanol (2:1, v/v). Na destičku byl aplikován celý objem 2 cm od dolního okraje na 1 cm start a chromatografie proběhla ve vysycené komoře ve směsi chloroform – methanol – voda (70:30:5, v/v/v) při laboratorní teplotě. Měření radioaktivity substrátu B-6-2 glykolipidu a glykosfingolipidových produktů jeho degradace bylo provedeno na lineárním scanneru (TLC analyzer V2.05, Německo).



### **3.3.3. Příprava substrátu Gb<sub>4</sub>Cer s neradioaktivní značkou**

#### **3.3.3.1. N-deacylace Gb<sub>4</sub>Cer solubilní SCDasou v přítomnosti BSA – příprava lyso-derivátu**

Do mikrozkušavek bylo odměřeno 2x 750 nmol zásobního roztoku Gb<sub>4</sub>Cer (izolace R. Dobrovolný [19]). Rozpouštědlo bylo odpařeno pod proudem dusíku a každý vzorek byl rozpuštěn v 1 ml acetátového pufru s 1% BSA {14,8 ml 0,2 M CH<sub>3</sub>COOH bylo smícháno s 35,2 ml 0,2 M CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O, pH bylo upraveno na 6,0 a nakonec byl přidán 1 g BSA}. Vzorky byly promíchány a sonikovány (Ultrasonic Homogenizer 4710, U.S.A.) a do každé mikrozkušavky bylo v průběhu dvoudenní inkubace (Inkubátor BE 300, Německo) při 37°C přidáno celkem 65 ml I.U. solubilní SCDasy. Reakce byla ukončena přidavkem 200 µl methanolu a následným odpařením roztoků v proudu dusíku v termostatu při 45°C. Výtěžek reakce byl stanoven HPTLC (viz. kap. 3.3.1.3. a 3.3.1.4.) s následným denzitometrickým vyhodnocením za použití kalibračního roztoku Gb<sub>4</sub>Cer pro sestavení kalibrační křivky o koncentracích 0,1; 0,2; 0,5, 1,0; 1,5 nmol/µl. Nezreagovaný Gb<sub>4</sub>Cer byl od lyso-Gb<sub>4</sub>Cer produktu oddělen na kapalinovém chromatografu za použití HPLC kolony 15 cm x 3 mm a za použití směsi chloroform – methanol – vody (65:35:8, v/v/v) jako mobilní fáze. Jednotlivé lipidní frakce byly sbírány po 0,6 ml pomocí automatického sběrače frakcí, čistota byla kontrolována HPTLC (viz. kap. 3.3.1.3.) a výtěžek vyhodnocen denzitometricky (viz. kap. 3.3.1.4.) [ 48, 49].

#### **3.3.3.2. Syntéza isoformy C19:0 Gb<sub>4</sub>Cer imobilizovanou SCDasou z deacylovaného Gb<sub>4</sub>Cer (lyso-Gb<sub>4</sub>)**

Ke 20 nmol vzorku lyso-Gb<sub>4</sub>Cer, získaného v předchozím kroku, bylo přidáno 20 nmol zásobního roztoku kyseliny nonadekanové (C19:0 MK) v methanolu. Do mikrozkušavky bylo k odparku přidáno 0,5 ml 0,1 M fosfátového pufru s 0,1% Tritonem X-100 (57,7 ml 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O bylo smícháno s 42,3 ml 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O a přidáno 0,1% Triton X-100). Vzorek v mikrozkušavce byl promíchán na Vortexu a sonikován (Ultrasonic Homogenizer 4710, U.S.A.) po dobu dvou minut. Obsah zkumavky byl následně přenesen do zkumavky s SCDasou imobilizovanou na celulosových partikulích, jejíž přípravou se zabýval L. Kuchař [50] a resyntéza probíhala po dobu 20 hodin při 37°C v inkubátoru (Inkubátor BE 300, Německo). Po ukončení doby inkubace byl supernatant se vzorkem přenesen do skleněné zkumavky, roztok odpařen v proudu dusíku a vzorek rozpuštěn ve 300 µl směsi chloroform – methanol (1:1, v/v). Výtěžek reakce byl stanoven HPTLC analýzou s následným denzitometrickým vyhodnocením (viz. kap. 3.3.1.3. a 3.3.1.4 .) [51].

## 4. Výsledky

### **4.1. Analýza glykolipidů krevní skupiny B v pankreatu a plicní tkáni pacientů s Fabryho chorobou**

Analýza celkových glykolipidů krevní skupiny B byla provedena v extraktech z autoptických vzorků pankreatu a plicní tkáně u pacientů s FD a u kontrol.

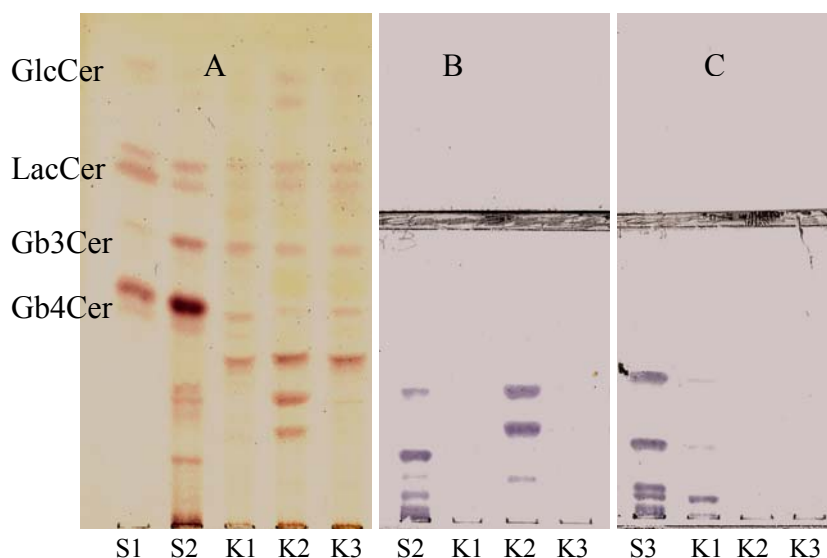
Nejprve bylo potřeba získat kontrolní vzorky tkání krevní skupiny B k porovnání ukládání analyzovaných glykosfingolipidů v tkáních pacientů s FD. Metodami popsanými v kapitole 3.3.1. bylo z celkových 15 vzorků pankreatů vyhodnoceno pouze dva s pozitivitou krevní skupiny B. Příklad této analýzy zobrazuje Obr.9 (viz str. 42). U plicní tkáně bylo obdobně analyzováno celkem šest vzorků, ani u jednoho však nebyla prokázána pozitivita pro krevní skupinu B.

V dalším kroku bylo zjišťováno zastoupení neutrálních glykosfingolipidů i glykolipidů krevní skupiny B v obou tkáních. Z orcinolové detekce neutrálních GSL izolovaných z pankreatické tkáně (viz. str. 43, Obr.10) je patrné zvýšené ukládání globotriaosylceramidu (Gb<sub>3</sub>Cer), nejběžnějšího přirozeného substrátu  $\alpha$ -GALA, u pacientů s FD v porovnání s kontrolními vzorky. Pozoruhodné ale je masivní ukládání glykolipidů krevní skupiny B u pacienta s FD s touto krevní skupinou, porovnáme-li jeho spektrum glykosfingolipidů s jiným pacientem s krevní skupinou A a s kontrolami. U plicní tkáně tak výrazné ukládání glykolipidů krevní skupiny B prokázáno nebylo, ačkoliv zóny jsou po imunodekci dobře zřetelné (viz. str. 44, Obr.11). Hlavním hromaděným lipidem byl klasicky Gb<sub>3</sub>Cer.

Stanovení glykolipidů krevní skupiny B bylo provedeno semikvantitativní denzitometrickou metodou, popsanou v kapitole 3.3.1.4. a tyto výsledky shrnuje Tab.11 (viz. str. 45). Z uvedené tabulky je zřejmé 10 – 20x zvýšená koncentrace všech tří sledovaných glykolipidových antigenů v pankreatu pacienta v porovnání s kontrolními vzorky. Dalším pozoruhodným zjištěním byla 300x zvýšená koncentrace glykolipidových antigenů krevní skupiny B v pankreatu pacienta oproti nálezům v plicní tkáni. Totéž prokázala i doplňující orcinolová detekce.

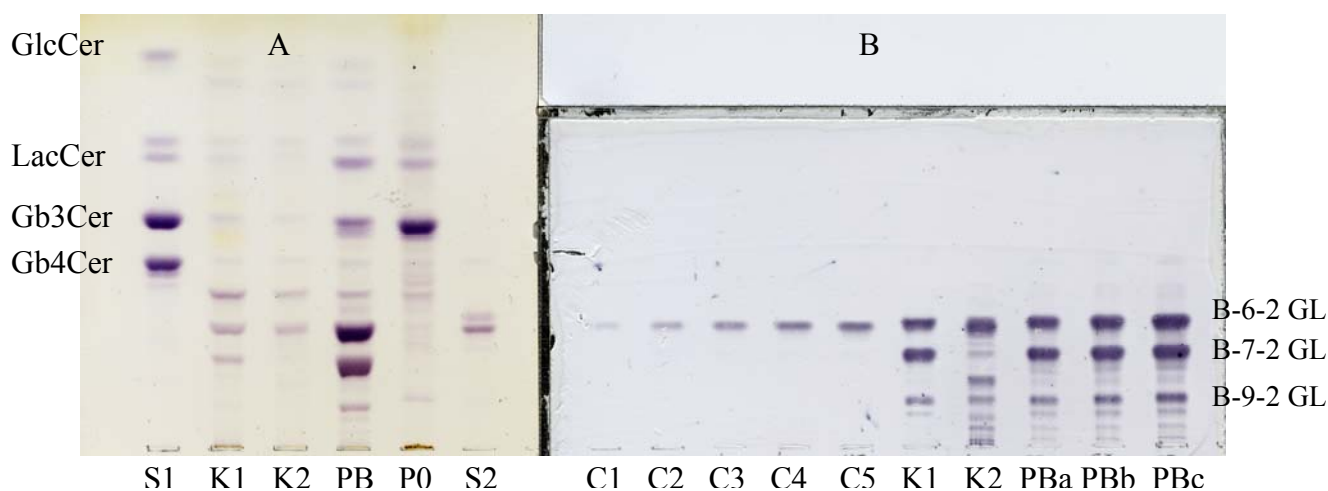
Zastoupení jednotlivých neutrálních glykosfingolipidů (SM, GlcCer, LacCer, Gb<sub>3</sub>Cer, Gb<sub>4</sub>Cer a lyso-Gb<sub>3</sub>Cer) bylo kvantitativně změřeno pomocí FIA-ESI MS/MS. Výsledky měření jsou

uvedeny v Tab.12 (viz. str. 45), ze které je zřejmý obecně vyšší obsah neutrálních glykolipidů, zejména Cer, LacCer, Gb<sub>3</sub>Cer a Gb<sub>4</sub>Cer, v plicní tkáni oproti jejich koncentraci v pankreatu. U pacientů s FD je patrný zvýšený obsah Gb<sub>3</sub>Cer dosahující až 20násobku hodnot u kontrolních vzorků. V pankreatické tkáni je zvýšená koncentrace Gb<sub>3</sub>Cer zejména u pacienta s FD krevní skupiny 0 a je až 10x vyšší v porovnání s kontrolními vzorky. U pacienta s FD krevní skupiny B je ukládaný Gb<sub>3</sub>Cer jen 5x vyšší než u kontrolních vzorků, což je výrazná změna oproti situaci u glykolipidů krevní skupiny B (viz. výše a str.45, Tab.11 a 12).



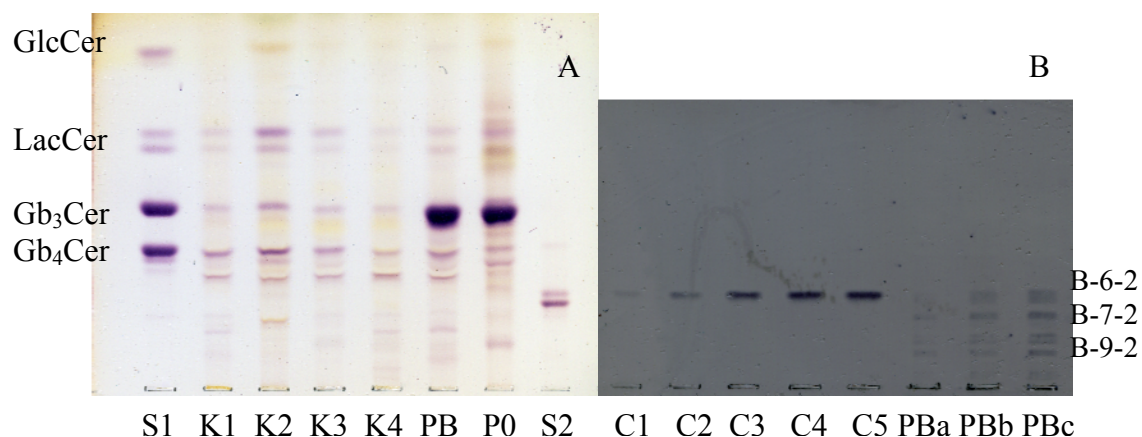
**Obr.9: Příklad TLC analýzy glykosfingolipidů krevních skupin při výběru kontrolních vzorků pankreatů krevní skupiny B**

Chromatogram A – chemická detekce pomocí orcinolového činidla; chromatogram B – imunodetekce pomocí myší monoklonální protilátky proti krevní skupině B; chromatogram C – imunodetekce pomocí myší monoklonální protilátky proti krevní skupině A. Vzorky: S1 – standard neutrálních GSL; S2 – komplexní směs B-glykolipidů; S3 – komplexní směs A-glykolipidů; K1 – K3 – kontroly. Vyvíjecí chromatografická soustava chloroform – methanol – voda (65:35:8, v/v/v).



**Obr.10: TLC analýza extraktů pankreatů pro denzitometrické semikvantitativní stanovení glykolipidů krevní skupiny B**

Chromatogram A – chemická detekce orcinolovým činidlem; chromatogram B – imunodetekce pomocí myší monoklonální protilátky proti krevní skupině B. Vzorky: S1 – standard neutrálních GSL; S2 – komplexní směs B-glykolipidů; K1 a K2 – kontroly (orcinol: naneseny alikvoty 150  $\mu$ g proteinu, imunodetekce: alikvoty 30  $\mu$ g proteinu); PB – FD pacient krevní skupina B (orcinol: naneseny alikvoty 150  $\mu$ g proteinu, imunodetekce: PBa, PBb, PBc = alikvoty 1,5; 3; 4,5  $\mu$ g proteinu); P0 – FD pacient krevní skupiny 0 (orcinol: alikvot 150  $\mu$ g proteinu); C1 – C5 kalibrační řada standard B-6-2 glykolipidu (4 – 32 pmol). Vyvíjející chromatografická soustava: chloroform – methanol – voda (65:35:8, v/v/v).



**Obr.11: TLC analýza extraktů plicní tkáně pro denzitometrické semikvantitativní stanovení glykolipidů krevní skupiny B**

Chromatogram A – chemická detekce pomocí orcinolového činidla; chromatogram B – imunodetekce pomocí myší monoklonální protilátky proti krevní skupině B. S1 – standard neutrálních GSL; S2 – komplexní směs B-glykolipidů K1, K2, K3 a K4 – kontroly (orcinol: naneseny alikvoty 150 µg proteinu); PB – FD pacient krevní skupina B (orcinol: naneseny alikvoty 150µg proteinu, imunodetekce: PBa,PBb,PBc = alikvoty 5; 12,5; 30 µg proteinu); P0 – FD pacient krevní skupina 0 (orcinol: alikvot 150 µg proteinu); C1 – C5 kalibrační řada standard B-6-2 glykolipidu (4 – 32 pmol). Vyvíjející chromatografická soustava: chloroform – methanol – voda (65:35:8, v/v/v).

B-glykolipidy nejsou v plicích výrazně zvýšeny (srovnej se vzorky pankreatu PB a P0 v Obr.10 (viz. str.43) a se vzorky PBa,b,c v Obr.10, kde je mnohonásobně nižší nanáška vzorku)

**Tab.11: Hodnoty koncentrací B-GL izolovaných z pankreatů a plic, odečtených z kalibrační křivky B-6-2 glykolipidu denzitometricky**

Vzorek	Tkáň	Koncentrace B-9-2 [nmol/μg proteinu]	Koncentrace B-7-2 [nmol/μg proteinu]	Koncentrace B-6-2 [nmol/μg proteinu]
Kontrola 1	pankreas	7,4	18,8	17,1
Kontrola 2	pankreas	8,7	5,6	38,3
Pacient FD	pankreas	<b>114,6</b>	<b>285,6</b>	<b>274,9</b>
Pacient FD	plíce	0,673	1,036	1,142

B-6-2 GL: hexasacharidový glykolipid krevní skupiny B z neolaktosérie

Gal(α1→3)[Fucα1→2]Gal(β1→4)GlcNAc(β1→3)Gal(β1→4)Glc(β1→1)Cer

B-7-2 GL: heptasacharidový glykolipid krevní skupiny B

Gal(α1→3)[Fucα1→2]Gal(β1→4) Fucα1→4]GlcNAc(β1→3)Gal(β1→4)Glc(β1→1)Cer

B-9-2 GL: dekasacharidový glykolipid krevní skupiny B

Gal(α1→3)[Fucα1→2]Gal(β1→4)Gal(α1→3)[Fucα1→4]Gal(β1→4)GlcNAc(β1→3)Gal(β1→4)Glc(β1→1)Cer

**Tab.12: Hodnoty koncentrací neutrálních GSL izolovaných z pankreatů a plic, analyzovaných tandemovou hmotnostní spektrometrií (FIA-ESI-MS/MS)**

Vzorek	Tkáň	Cer	GlcCer	LacCer <sup>*</sup>	Gb <sub>3</sub> Cer	Gb <sub>4</sub> Cer	SM
[ng/μg proteinu]							
K	plíce	3,3 ± 1,4	0,9 ± 0,6	<b>6,2 ± 4,8</b>	<b>1,7 ± 0,8</b>	1,4 ± 0,6	39,7 ± 6,1
PB	plíce	2,5	1,6	<b>7,2</b>	<b>26,0</b>	1,2	67,4
P0	plíce	4,0	1,9	<b>18,9</b>	<b>31,1</b>	0,9	44,1
K	pankreas	1,3 ± 0,4	1,5 ± 1,0	<b>2,1 ± 0,8</b>	<b>0,8 ± 0,1</b>	0,4 ± 0,2	26,5 ± 11,5
PB	pankreas	1,9	4,6	<b>11,6</b>	<b>5,4</b>	0,3	16,4
P0	pankreas	0,8	1,1	<b>6,0</b>	<b>10,2</b>	0,2	13,4

K – aritmetický průměr hodnot ze čtyř kontrol (K1,K2,K3,K4) ± výběrová směrodatná odchylka; PB – FD pacient krevní skupiny B; P0 – FD pacient krevní skupiny 0; \* frakce LacCer obsahuje laktosylceramid a digalaktosylceramid

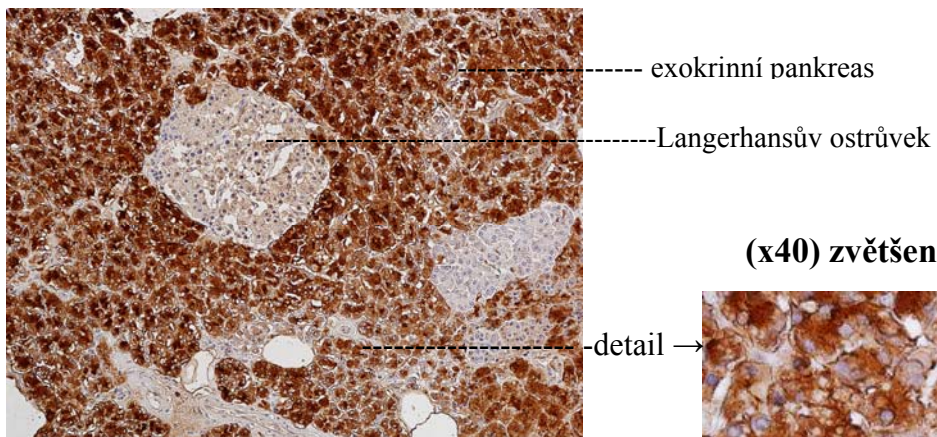
## **Imunohistochemická analýza antigenů krevní skupiny B**

V dalším kroku byla provedena analýza antigenů krevní skupiny B v parafinových řezech pankreatů pacienta s FD a krevní skupinou B a kontroly, metodou popsanou v kapitole 3.3.1.6., s cílem porovnání exprese těchto antigenů u Fabryho nemoci a pro získání přehledu o expresi v různých částech pankreatu (viz. str. 47 – 48, Obr.12 – 15). Za těchto podmínek (použitím parafinových řezů) lze detekovat pouze glykoproteiny krevní skupiny B, jelikož lipidní složky jsou odstraněny ze vzorku při odvodnění tkáně organickými rozpouštědly.

U pacienta s FD je silná pozitivita antigenů krevní skupiny B v apikální části cytoplasmy acinárních buněk. Obraz je prakticky uniformní v rámci exokrinní části pankreatu (viz. str. 47, Obr.12 a 13). V kontrolním pankreatu je pozitivita méně intenzivní a jsou velké rozdíly v expresi antigenu mezi jednotlivými aciny exokrinního pankreatu (viz. str.48, Obr.14). Řada z nich nevykazuje pozitivní signál. Na obrázcích jsou dále zobrazeny neexprimující Langerhansovy ostrůvky, epiteliální buňky vývodu a vazivová septa oddělující jednotlivé lalůčky složené z acinárních buněk.

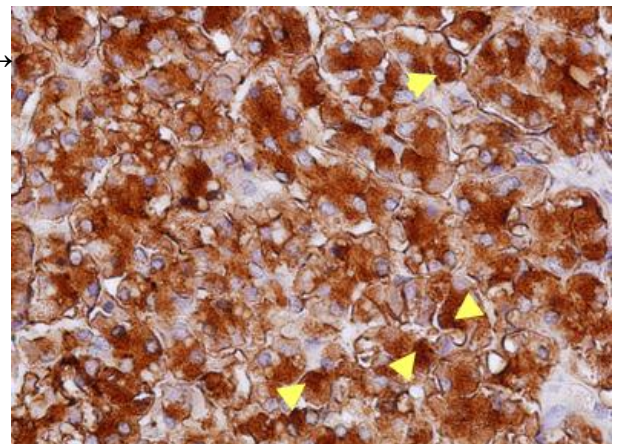
Vzhledem k tomu, že střádáním postižené lysosomy v pankreatu s FD akumulují i značné množství autofluorescentního ceroidu, korelovali jsme tuto autoflorescenci se signálem pro B-glykoproteinový antigen. Autofluorescentní lysosomy však nevykazovaly žádný signál pro antigeny krevní skupiny B (viz. str.48, Obr.15). Kdyby byl tento signál dostatečně silný, došlo by až k potlačení autoflorescence lysosomů. Lze tedy říci, že střádáním postižené lysosomy v pankreatu s FD neakumulují detekovatelné množství glykoproteinového homologu krevní skupiny B.



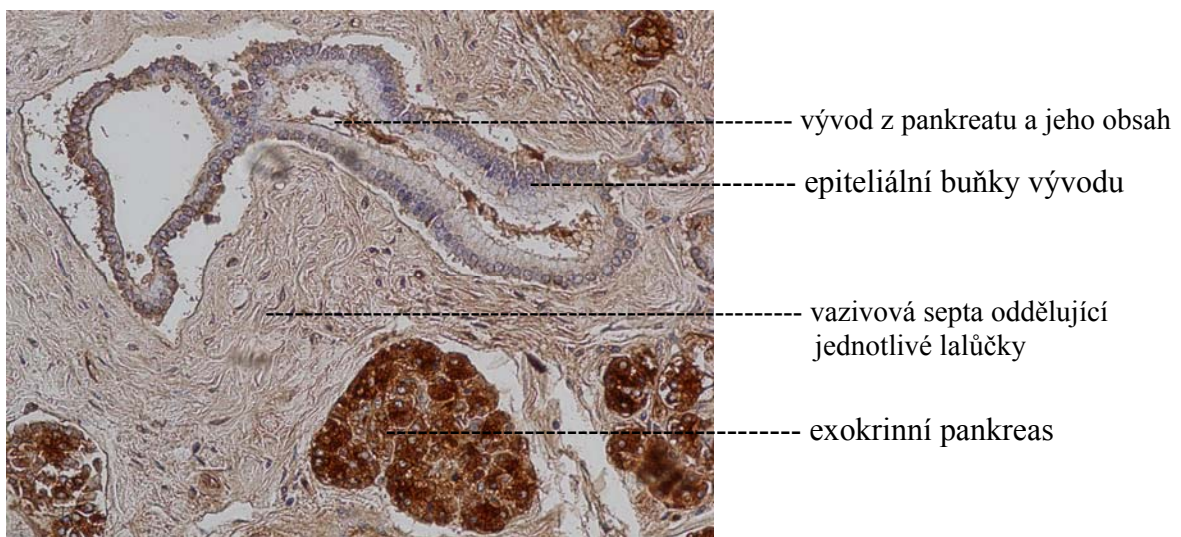


**Obr.12: FD pankreas, krevní skupina B  
(objektiv x10)**

**(x40) zvětšení**

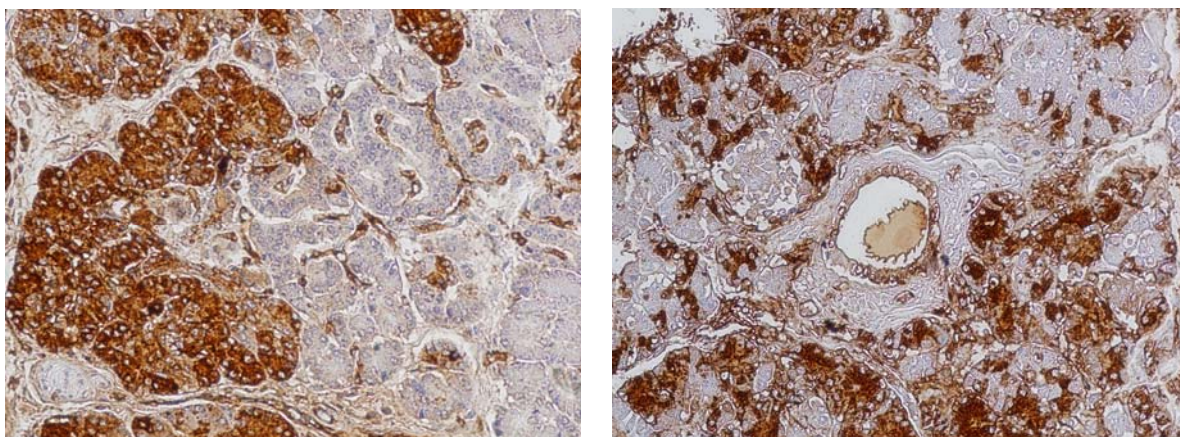


šipky označují apikální oblast acinární buňky



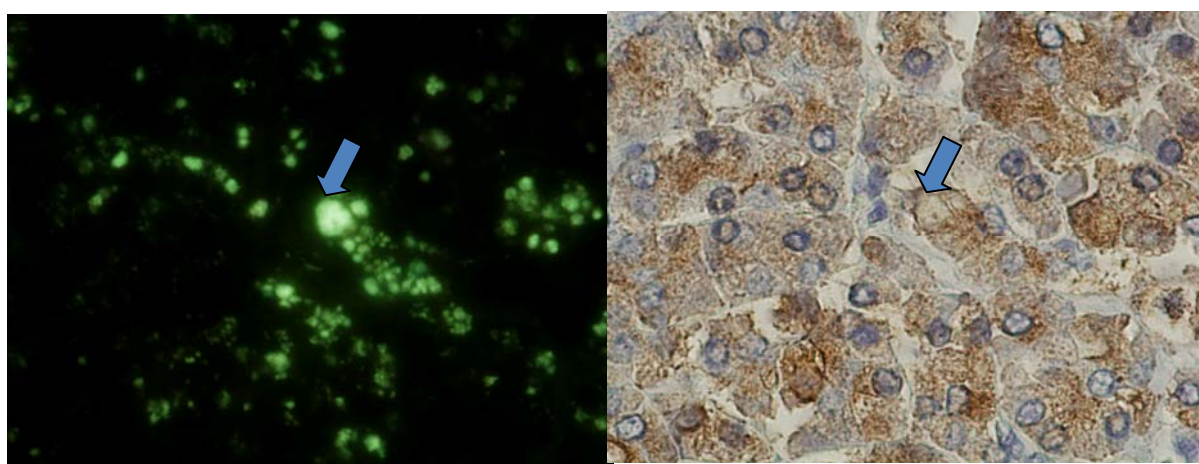
**Obr.13: FD pankreas, krevní skupina B  
(objektiv x40)**





**Obr.14: Kontrolní pankreas, krevní skupina B (objektiv x20)**

Obrázek vlevo znázorňuje rozdílnou expresi (mozaiku) B-glykoproteinů v acinárních buňkách. Na obrázku vpravo je zobrazen vývod z pankreatu a jeho obsah.



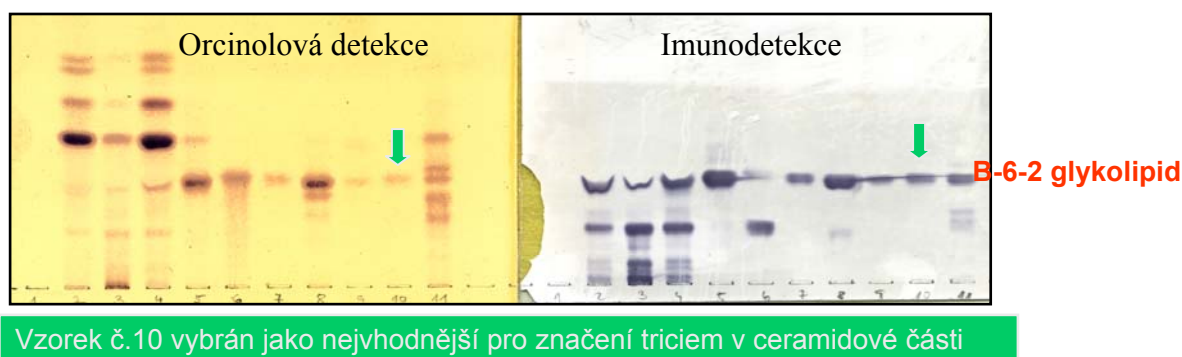
**Obr.15: Kontrolní pankreas, krevní skupina B (objektiv x60)**

Na obrázku vlevo je modrou šipkou zobrazen autofluorescentní ceroid, stejné místo na obrázku vpravo nevykazuje žádný výrazný signál pro antigen krevní skupiny B.

## 4.2. Zátěžové experimenty v buněčných kulturách

### 4.2.1. Příprava [<sup>3</sup>H]B-6-2 glykolipidu

Kvůli komerční nedostupnosti tohoto přirozeného substrátu  $\alpha$ -GALA, bylo nutné jej připravit v laboratoři. Metodami popsanými v kapitole 3.3.2.1. byl získán čistý preparát B-6-2 glykosfingolipidu (Obr.16), jehož struktura byla ověřena metodou ESI-MS a který byl použit k značení tritiem v ceramidové části. Značený [<sup>3</sup>H]B-6-2 glykolipid o celkové radioaktivitě 26 MBq byl dále použit jako substrát pro zátěžové experimenty v mutantních a kontrolních buňkách.



**Obr.16: Příklad analýzy archivovaných vzorků glykolipidů krevní skupiny B z erytrocytární membrány pro výběr B-6-2 glykolipidu pro značení tritiem.**

### 4.2.2. Analýza kultivovaných kožních fibroblastů: *in vitro* aktivity enzymů a analýza sfingolipidů

V další části práce byly připraveny následující kultury lidských kožních fibroblastů: kontrolní buňky, buňky s deficitem  $\alpha$ -GALA (Fabryho choroba), s deficitem  $\alpha$ -NAGA (Schindlerova choroba), buňky s deficitem prosaposinu a s deficitem saposinu B (viz. kap. 3.3.2.2.).

Část buněk byla použita pro *in vitro* stanovení aktivity  $\alpha$ -GALA se syntetickým fluorescenčním substrátem (s inhibicí  $\alpha$ -NAGA a bez inhibice), aktivity  $\beta$ -galaktosidasy jako kontrolního enzymu a aktivity  $\alpha$ -NAGA. Naměřené hodnoty těchto aktivit shrnuje Tab. 13 (viz. str.50). U pacientů s FD byla po inhibici  $\alpha$ -NAGA aktivita  $\alpha$ -GALA blízká nule v porovnání s kontrolním vzorkem. Při měření bez inhibice byla přítomna malá reziduální aktivita. U buněk s deficitem prosaposinu byly *in vitro* aktivity všech měřených enzymů normální. Naopak v buňkách pacientů s Schindlerovou chorobou byl jednoznačně potvrzen deficit  $\alpha$ -NAGA.

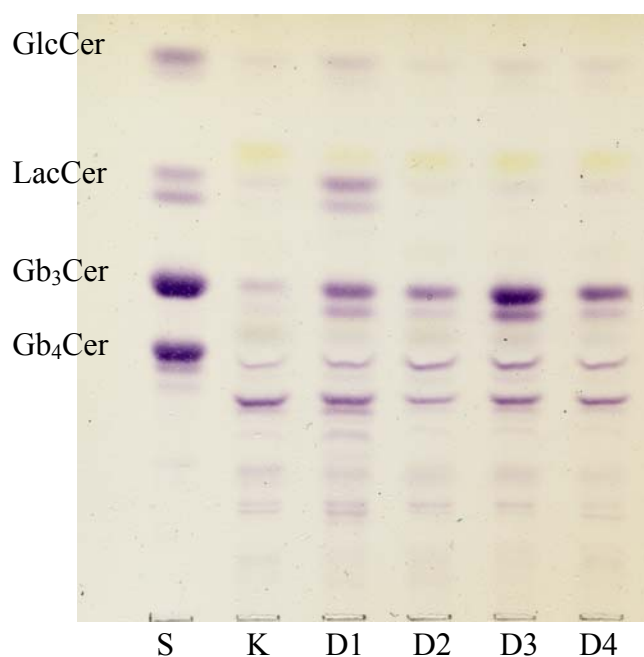
Stejné homogenáty buněk byly dále použity ke kvantitativnímu stanovení jednotlivých sfingolipidů (SM, GlcCer, LacCer, Gb<sub>3</sub>Cer, Gb<sub>4</sub>Cer a lyso-Gb<sub>3</sub>Cer) pomocí FIA-ESI MS/MS (viz. str.51, Tab.14). Pro lepší orientaci byla ještě provedena doplňující chromatografická analýza na tenké vrstvě silikagelu (viz. str.51, Obr.17). Z hodnot naměřených FIA-ESI MS/MS jsme zjistili až 4x vyšší obsah Gb<sub>3</sub>Cer u pacienta s deficitem  $\alpha$ -GALA. Ostatní GSL se pohybují v rozmezí normálních hodnot. Deficit prosaposinu má za následek větší počet nedegradovaných GSL a to zejména Cer a LacCer, jejichž hodnoty jsou až 5x vyšší v porovnání s kontrolou, dále pak GlcCer a Gb<sub>3</sub>Cer. U deficitu saposinu B pozorujeme pouze mírně zvýšený Gb<sub>3</sub>Cer. U deficitu  $\alpha$ -NAGA nebyly zjištěny žádné významné změny ve spektru sfingolipidů.

**Tab.13: Hodnoty aktivit  $\alpha$ -galaktosidasy A v lidských fibroblastech**

Vzorek	Aktivita $\alpha$ -GALA (inhibice $\alpha$ -NAGA) [nmol.mg <sup>-1</sup> .hod <sup>-1</sup> ]	Aktivita $\beta$ -GAL [nmol.mg <sup>-1</sup> .hod <sup>-1</sup> ]	Aktivita $\alpha$ -GALA (bez inhibice $\alpha$ -NAGA) [nmol.mg <sup>-1</sup> .hod <sup>-1</sup> ]	Aktivita $\alpha$ -NAGA [nmol.mg <sup>-1</sup> .hod <sup>-1</sup> ]
FD pacient 1 (Č)	0,5	364	3,4	102
FD pacient 2 (H)	0,87	1032	5,0	126
Deficit $\alpha$ -NAGA	34,2	5136	35,6	1,9
Deficit prosaposinu	86	1033	104	111
Kontrola HD	54,5	576	66	136
Kontrola KU	34,5	324	39,6	106

**Tab.14: Koncentrace neutrálních GSL v extraktech kožních fibroblastů, analyzovaných tandemovou hmotnostní spektrometrií (FIA:ESI MS/MS)**

Vzorek	Cer	Lyso-GlcCer	GlcCer	LacCer	Gb3Cer	Gb4Cer	SM
[ng/μg proteinu]							
Deficit							
α-GALA (Č)	0,8	0,7	4,4	0,6	<b>11,4</b>	1,3	38,1
Deficit							
prosaposinu	<b>4,7</b>	0,6	<b>7,4</b>	<b>2,6</b>	<b>6,4</b>	1,2	29,9
Deficit							
SAP-B	0,7	0,7	3,0	0,4	<b>5,5</b>	1,1	36,8
Deficit							
α-NAGA	0,8	0,7	1,6	0,3	4,1	1,6	34,4
Kontrola	0,9	0,7	2,4	0,4	2,9	1,2	39,1



**Obr.17: TLC analýza neutrálních GSL v extraktech lidských kožních fibroblastů**

Chromatogram – chemická detekce orcinolovým činidlem. Vzorky: S – standard neutrálních GSL; K – kontrola; D1 – deficit prosaposinu; D2 – deficit α-NAGA; D3 – deficit α-GALA; D4 – deficit saposinu-B. Vyvíjející chromatografická soustava: chloroform – methanol – voda (65:35:8, v/v/v).

Výrazné zvýšení glykosfingolipidů s 1 – 3 monosacharidy u prosaposinového deficitu, zvýšení Gb<sub>3</sub>Cer u deficitu aktivity α-GALA (Fabryho choroba).

#### 4.2.3. Vyhodnocení zátěžových experimentů se substrátem [<sup>3</sup>H]B-6-2 v kulturách kožních fibroblastů

Další část buněk byla použita k pětidenním zátěžovým experimentům se značeným [<sup>3</sup>H]B-6-2 glykolipidem s následným vyhodnocením tvorby produktů. Integrační hodnoty radioaktivit, vztažené na protein, shrnuje Tab.15.a Obr.18. (viz. str.53) Do všech buněčných kultur byl přidán conduritol B-epoxid, inhibitor  $\beta$ -glukocerebrosidasy, aby se zastavilo odbourání glukosylceramidu (GL-1), který je posledním glykolipidem v katabolickém schématu. V buňkách s deficitem  $\alpha$ -GALA,  $\alpha$ -NAGA a saposinu B jsme nepozorovali žádnou výraznou akumulaci ani u jednoho ze sledovaných glykolipidů. V případě deficitu prosaposinu byl zjištěn významný blok v odbourávání glykolipidů se čtyřmi (GL-4) a dvěma (GL-2) monosacharidy v řetězci (viz str.53, Obr.18).

**Tab.15: Zátěžové experimenty v kulturách fibroblastů s glykolipidovým substrátem [<sup>3</sup>H]B-6-2 v přítomnosti CBE inhibitoru**

Záznamy radioscaneru v arbitrárních jednotkách vztažené na  $\mu$ g protein.

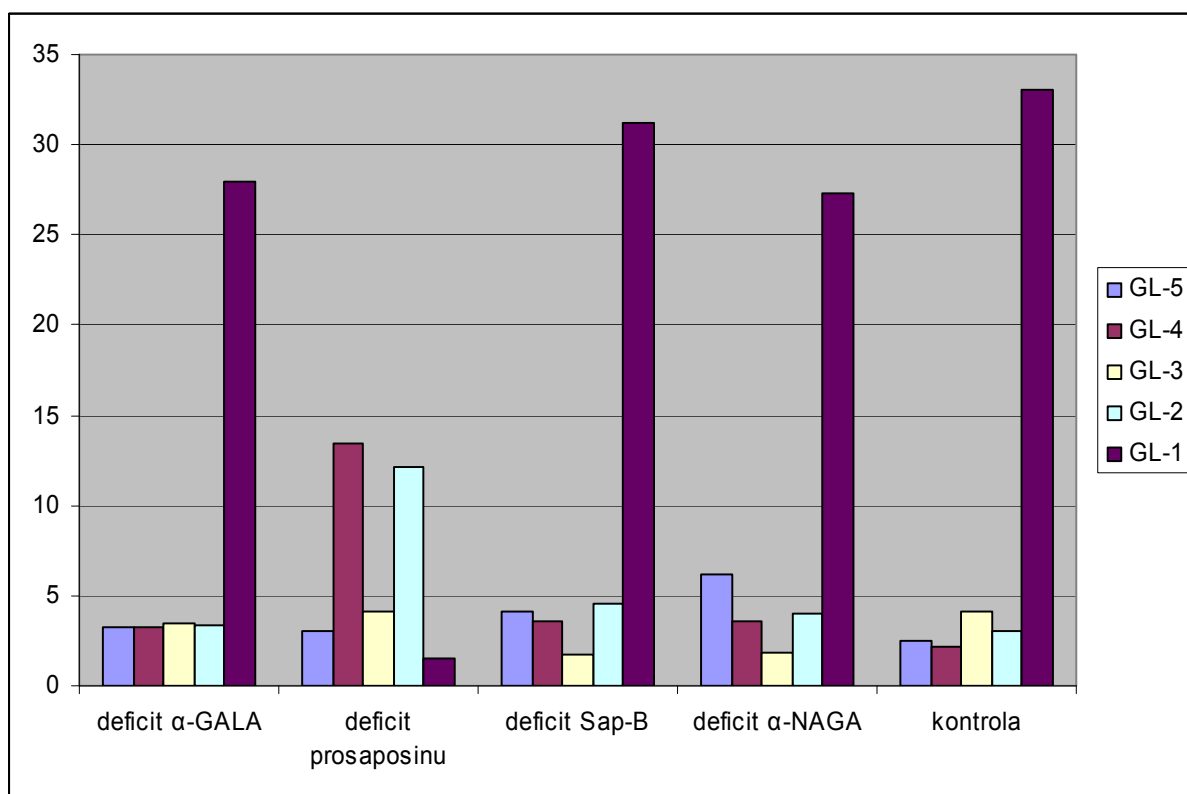
Vzorek	Substrát B-6-2 značený tritiem	GL-5	GL-4	GL-3	GL-2	GL-1	Celková tvorba produktů [%]
Deficit $\alpha$ -GALA (C)	214	12	12	13	12	102	41
<b>Deficit prosaposinu</b>	<b>360</b>	<b>17</b>	<b>74</b>	<b>23</b>	<b>67</b>	<b>8</b>	<b>34</b>
Deficit Sap-B	180	13	12	6	15	102	45
Deficit $\alpha$ -NAGA	200	21	12	6	14	95	43
Kontrola	212	9	8	16	11	127	45

Hodnoty uvedené v tabulce jsou přístrojové odezvy radioscaneru za 10 minut.

B-6-2 GL: hexasacharidový glykolipid krevní skupiny B z neolaktosérie

Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)[Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2]Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Glc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 1)Cer

GL-5 – GL-1: glykolipidy, kde číslice udává počet zbylých sacharidových jednotek při postupném odbourávání B-6-2 glykolipidu příslušnými glykosidasami od neredukujícího konce oligosacharidového řetězce



**Obr.18: Výsledky zátěžových experimentů s glykosfingolipidem [<sup>3</sup>H] B-6-2 v buněčných kulturách fibroblastů v přítomnosti CBE. Integrační hodnoty radioaktivit (v procentech) vztahované na protein.**

B-6-2 GL: hexasacharidový glykolipid krevní skupiny B z neolaktosérie

Gal(α1→3)[Fucα1→2]Gal(β1→4)GlcNAc(β1→3)Gal(β1→4)Glc(β1→1)Cer

GL-5 – GL-1: jsou glykolipidy, kde číslice udává počet zbývajících sacharidových jednotek při postupném odbourávání B-6-2 glykolipidu

Prosaposinový deficit je charakterizován výraznou změnou spektra GSL

### **4.3. Příprava substrátu Gb<sub>4</sub>Cer s neradioaktivní značkou**

Pro přípravu Gb<sub>4</sub>Cer s neradioaktivní značkou (C19:0 Gb<sub>4</sub>Cer) bylo nejprve potřeba připravit jeho lyso-derivát N-deacylací Gb<sub>4</sub>Cer pomocí solubilní komerční SCDasy v přítomnosti detergentu (viz. kap. 3.3.3).

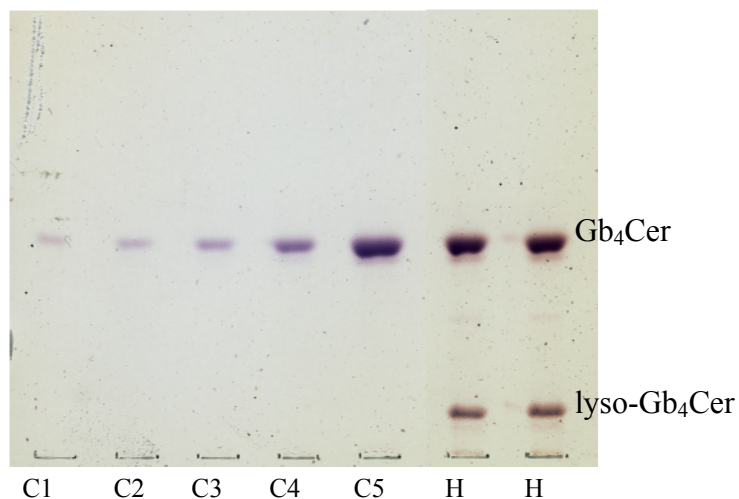
Při optimalizaci podmínek byly vyzkoušeny dva typy reakcí, obsahující buď detergent (Triton X-100) nebo BSA. Obě reakce probíhaly za stejných podmínek (viz. kap.3.3.3.1) a výtěžky byly stanoveny denzitometricky. Výsledky shrnuje Obr.19 (viz str. 55). Lepší výtěžek poskytla reakce s BSA (30%) oproti reakci obsahující Triton X-100 (15%).

Pro zpětnou reakci k přípravě isoformy C19:0 Gb<sub>4</sub>Cer imobilizovanou SCDasou bylo nejprve nutné oddělit nezreagovaný substrát od jeho produktu a případných kontaminujících látek na HPLC koloně. Jako mobilní fáze byla použita směs chloroform – methanol – voda (65:35:8, v/v/v). Čistota jednotlivých lipidních frakcí byla kontrolována HPTLC (viz. str.55, Obr.20). Frakce odpovídající lyso-Gb<sub>4</sub>Cer byly spojeny a čistota spojeného vzorku byla prokázána pomocí FIA-ESI MS (viz. str. 56, Obr.21).

Zpětná reakce byla spuštěna nejprve bez přítomnosti detergentu. Pro malý výtěžek produktu, (40%), proto byl nadále do reakční směsi přidáván detergent 0,1% Triton X. Výtěžek této reakce se pohyboval okolo 90% (viz. str.55, Obr.22). Pomocí FIA-ESI MS/MS bylo poté zjišťováno zastoupení jednotlivých isoform v resyntetizovaném Gb<sub>4</sub>Cer. Z Obr.23 (viz. str. 57) je však patrné, že kromě požadované isoformy C19:0 Gb<sub>4</sub>Cer vzorek obsahoval značný podíl kontaminujících isoform C16:0 a C18:0 Gb<sub>4</sub>Cer.

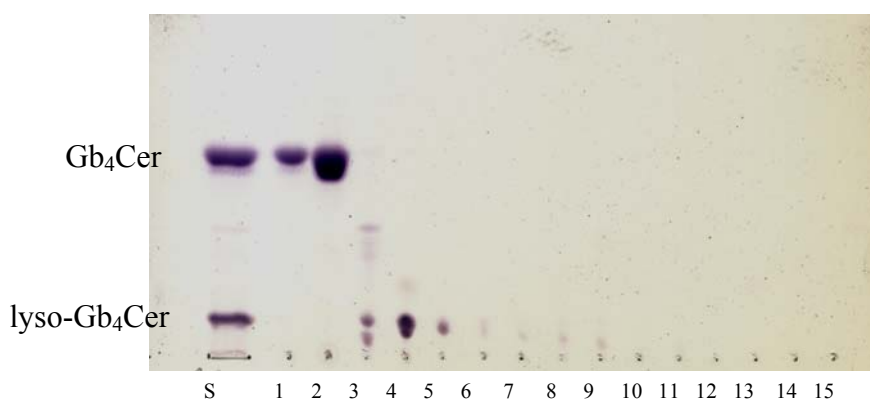
Imobilizovaný enzym byl proto znovu důkladně promyt a zároveň byla provedena i kontrola čistoty kyseliny nonadekanové, která byla k resyntéze použita. Příměs kyselin C16:0 a C:18:0 nebyla prokázána (viz. str. 57, Obr.24). Proto byla dále provedena chloroform – methanolová extrakce lipidů v komerčním preparátu SCDasy a následně analýza mastných kyselin pomocí FIA-ESI MS/MS. Touto metodou byla v extraktu prokázána přítomnost obou mastných kyselin, C16:0 a C18:0 (viz. str. 58, Obr.25).





**Obr.19: HPTLC analýza pro denzitometrické stanovení výtěžku lyso-Gb<sub>4</sub>Cer získaného N-deacylací Gb<sub>4</sub>Cer solubilní SCDasou v přítomnosti BSA**

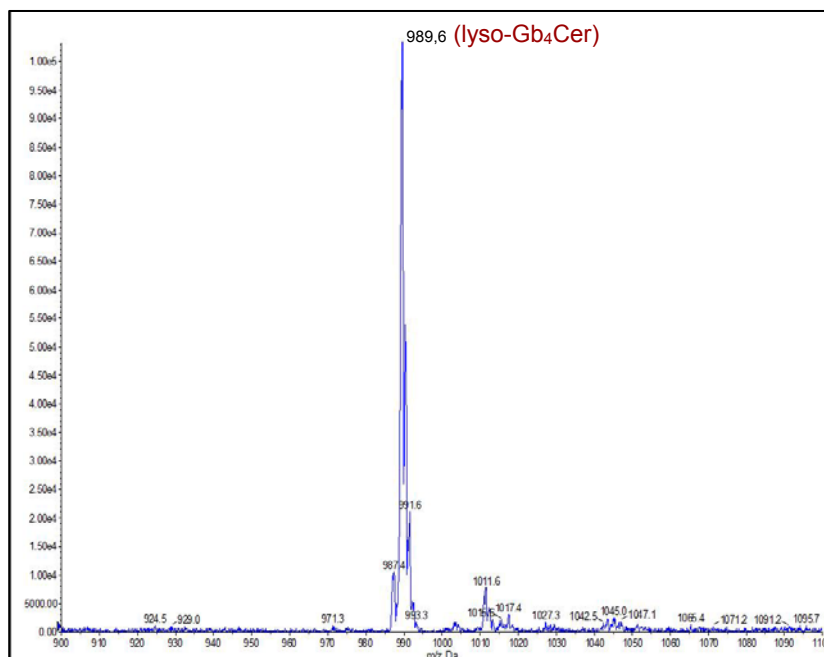
Chromatogram – chemická detekce pomocí orcinolového činidla. Vzorky: C1 – C5 kalibrační řada standard Gb<sub>4</sub>Cer (0,05 – 1 nmol); H – vzorky Gb<sub>4</sub>Cer po N-deacylaci solubilní SCDasou v přítomnosti BSA, které probíhaly v doubletech (výtěžky obou reakcí okolo 30%). Vyvíjející chromatografická soustava: chloroform – methanol – voda (65:35:8, v/v/v).



**Obr.20: HPTLC analýza HPLC frakcí při kontrole čistoty připraveného lyso-Gb<sub>4</sub>Cer separovaného od substrátu Gb<sub>4</sub>Cer**

Chromatogram – chemická detekce pomocí orcinolového činidla; 1 – 15 jednotlivé lipidní frakce sbírané po 0,6 ml objemech. Vyvíjející chromatografická soustava: chloroform – methanol – voda (65:35:8, v/v/v).



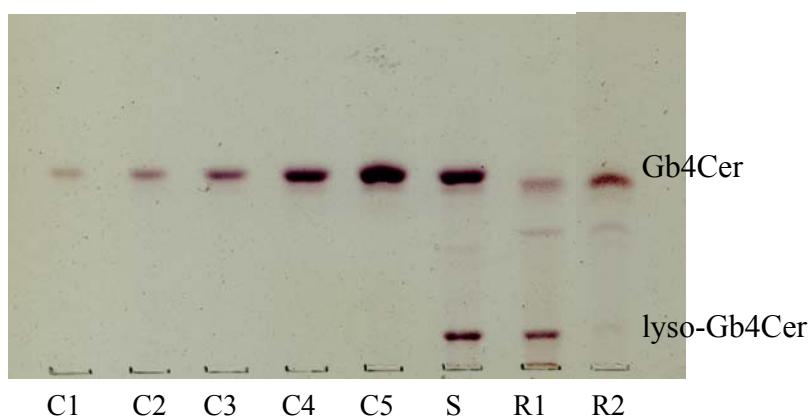


**Obr.21: FIA-ESI-MS analýza připraveného lyso-Gb<sub>4</sub>Cer - nejčistší HPLC frakce, která byla použita pro zpětnou reakci při syntéze isoformy C19:0 Gb<sub>4</sub>Cer imobilizovanou SCDasou (frakce 4 na str.55, Obr.20)**

*Reakční směs:* 750 nmol Gb<sub>4</sub>Cer + 1 ml acetátového pufru s 1% BSA + 65 mIU. solubilní SCDasy

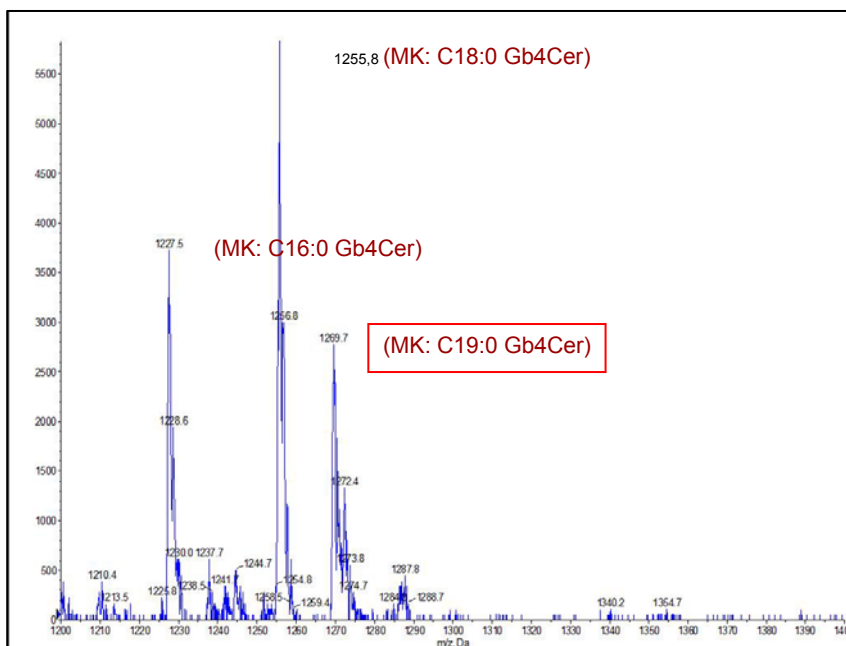
*Vzorek k analýze:* 0,25 nmol lyso-Gb<sub>4</sub>Cer ve 400 µl ionizačního roztoku: 5 mM roztok NH<sub>4</sub>COOH v methanolu

*Měření:* 1 minutový scan v pozitivním režimu



**Obr.22: TLC analýza pro denzitometrické stanovení výtěžku isoformy C19:0 Gb<sub>4</sub>Cer. Resyntéza pomocí imobilizované SCDasy z deacylovaného Gb<sub>4</sub>Cer (lyso-Gb<sub>4</sub>Cer).**

Chromatogram – chemická detekce pomocí orcinolového činidla. Vzorky: C1 – C5 kalibrační řada standard Gb<sub>4</sub>Cer (0,05 – 1 nmol); S – standard; R1 – zpětná reakce (resyntéza) bez přidavku detergentu (výtěžek reakce: 40 %); R2 – zpětná reakce (resyntéza) s přidavkem 0,1 % Tritonu X-100 (výtěžek reakce: 90 %). Vyvíjecí chromatografická soustava: chloroform – methanol – voda (65:35:8, v/v/v).

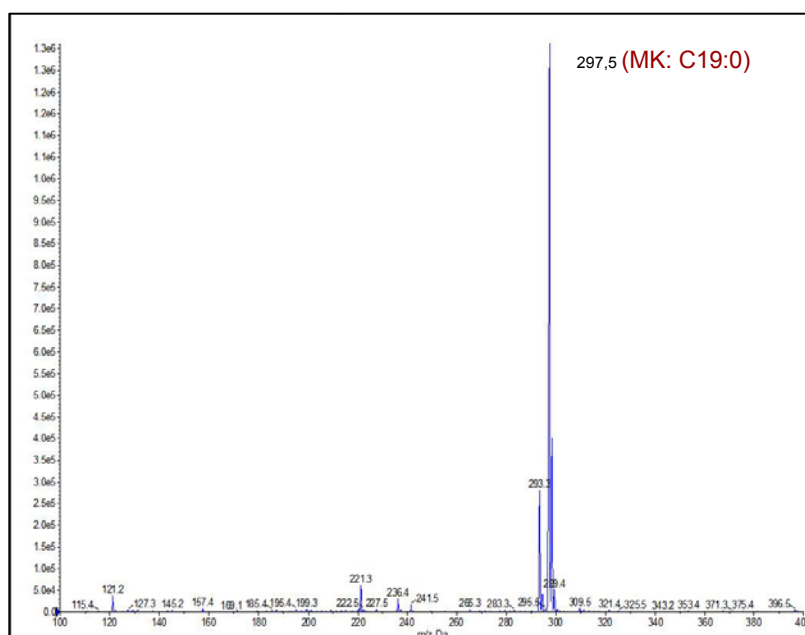


**Obr.23: FIA-ESI MS/MS analýza isoform nově syntetizovaného Gb<sub>4</sub>Cer po reakci s imobilizovanou SCDasou**

*Reakční směs:* 20 nmol lyso-Gb<sub>4</sub>Cer + 20 nmol kyseliny nonadekanové (C19:0) + 0,5 ml 0,1 M fosfátového pufru s 0,1 % Tritonem X-100 + imobilizovaná SCDasa

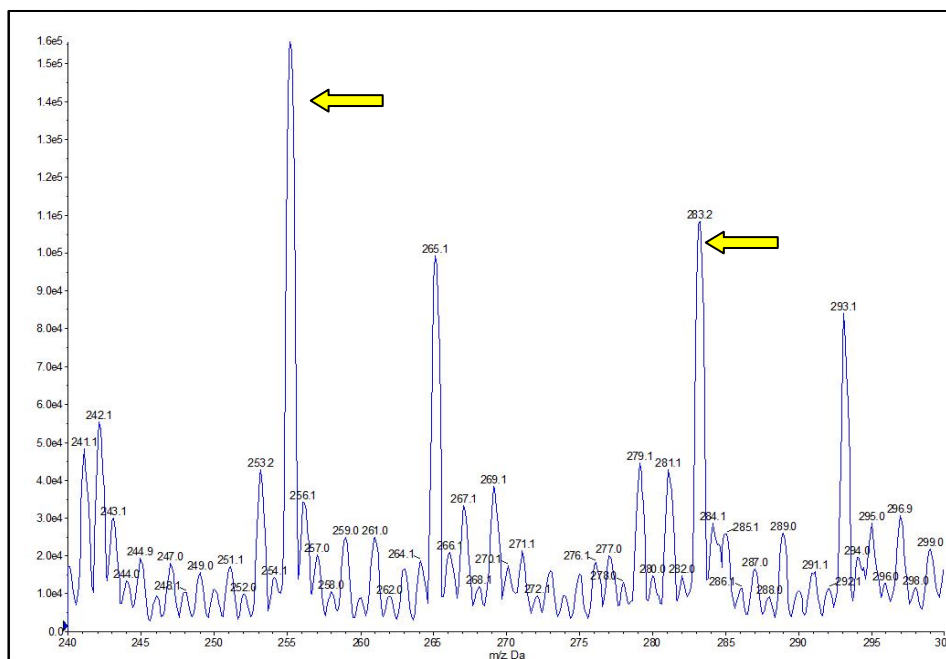
*Vzorek k analýze:* 0,2 nmol Gb<sub>4</sub>Cer ve 400 µl ionizačního roztoku: 5 mM roztok NH<sub>4</sub>COOH v methanolu

*Měření:* 1 minutový scan precursorových iontů obsahujících dceřiný iont o m/z 264,4 v pozitivním režimu



**Obr.24: FIA-ESI-MS analýza kontroly čistoty kyseliny nonadekanové**

*Vzorek k analýze:* 10 nmol kyseliny nonadekanové ve 200 µl methanolu (1 min. scan v negat. režimu)



**Obr.25: ESI-MS/MS analýza celkového chloroform – methanolového extraktu komerční SCDasy**

*Vzorek k analýze:* Extrakce 5 ml.U. SCDasy směsí chloroform – methanol (2:1, v/v), chloroformová fáze odpařena a před analýzou rozpuštěna ve 200  $\mu$ l methanolu

*Měření:* 1 minutový scan v negativním režimu

## 5. Diskuse

### **5.1. Analýza glykolipidů krevní skupiny B v pankreatu a v plicní tkáni pacientů s Fabryho chorobou**

V roce 1974 zjistili Wherett a Hakomori [22] v pankreatu FD pacienta, že kromě digalaktosylceramidu a globotriaosylceramidu dochází k hromadění ještě další neznámé látky, jejíž vysoká koncentrace nebyla v jiných orgánech pozorována. Pomocí chromatografických metod dále zjistili, že tato látka lipidního charakteru putuje v tenké vrstvě silikagelu pomaleji než známý glykolipid s pentasacharidovým řetězcem, což naznačovalo, že se jedná o glykolipid s hexasacharidovým řetězcem. Zjistili, že obsahuje fukosu, galaktosu, glukosamin a glukosu v molárním poměru 1:3:1:1, že koncová trisacharidová determinanta vykazuje antigenní vlastnosti shodné s B-imunopozitivními GSL erytrocytární membrány a posléze potvrdili strukturu glykolipidních B antigenů.

V minulém roce jsme měli v ÚDMP výjimečnou příležitost analyzovat autoptický materiál dalšího FD pacienta s krevní skupinou B a pokusit se odpovědět na otázku, do jaké míry se B glykolipidy podílí na substrátové zátěži u této jinak metabolicky dobře definované poruchy. Zaměřili jsme se na pankreas a plíce.

Pro tuto analýzu bylo nejprve zapotřebí získat kontrolní vzorky tkání B krevní skupiny, aby bylo možné porovnat skladbu glykolipidového spektra u kontrol a u pacientů s FD. Mezi 15 archivovanými vzorky pankreatů se však podařilo prokázat krevní skupinu B jen u dvou vzorků, mezi 6 vzorky plic nebyla zachycena ani jedna krevní skupina B. Tento nízký záchyt je dán statisticky nízkým zastoupením této krevní skupiny v evropské populaci, kde krevní skupina B tvoří pouhých 8,5 % [32].

Zajímavým nálezem v naší studii byl obecně větší obsah neutrálních sfingolipidů, zejména Cer, LacCer, Gb<sub>3</sub>Cer a Gb<sub>4</sub>Cer, v plicní tkáni kontrol než-li v pankreatu. U Fabryho choroby jsme v plicní tkáni dle očekávání prokázali zvýšený obsah Gb<sub>3</sub>Cer, hlavního substrátu  $\alpha$ -GALA. V pankreatu u pacientů s FD byl Gb<sub>3</sub>Cer ukládán v menší míře než v plicích, oproti kontrole však byla jeho koncentrace také významně zvýšena. Tyto rozdíly mohou souviset s rozdílným typem buněk v obou tkáních, které mohou mít různý metabolický obrat tohoto lipidu. V dřívějších studiích bylo prokázáno, že množství ukládaného Gb<sub>3</sub>Cer u pacienta s FD se může lišit v rozmezí deseti- až stonásobků u různých orgánů, jako jsou např. ledviny, játra, cévní endotel, myokard a plíce, pravděpodobně ve vztahu k metabolickému obratu a biologickým funkcím Gb<sub>3</sub>Cer v těchto orgánech [16]. Pozoruhodným nálezem v pankreatu pacienta s FD a

krvní skupinou B je však masivní ukládání B-6-2 glykolipidu oproti substrátu Gb<sub>3</sub>Cer, které je z hlediska srovnání s ostatními orgány u Fabryho nemoci unikátní. V porovnání s kontrolním pankreatem krevní skupiny B, je u FD pacienta koncentrace glykolipidových B-antigenů 300x vyšší. Hromadění B-6-2 glykolipidu bylo již dříve prokázáno i v epiteliích žaludku a střeva a také ve formě sekretů, ale v daleko menší míře. Toto zjištění pankreas významně odlišuje od ostatních tkání, kde hlavním střídaným materiálem je vždy Gb<sub>3</sub>Cer [22].

### **Imunohistochemická analýza antigenů krevní skupiny B**

Krevní antigeny včetně B-6-2 glykolipidu a jiné komplexnější krevní GSL nejsou vázány pouze na erytrocytární membránu, ale jsou přítomny ve formě glykolipidů i glykoproteinů v membránách buněk nejrůznějších tkáních, např. slinivky, tenkého střeva, cév, ledvin a dalších orgánů. V rozpustné formě jsou přítomny v sekretech převážně ve formě glykoproteinů [32]. Zajímalo nás proto, do jaké míry se porucha degradace v oligosacharidovém řetězci obsahujícím  $\alpha$ -galaktosu týká také glykoproteinů a jaká je exprese antigenů v různých částech pankreatu.

Provedli jsme proto imunohistochemickou analýzu antigenů krevní skupiny B v parafinových řezech pankreatu, pro porovnání exprese antigenů krevní skupiny B mezi pacientem s FD a kontrolou a pro získání přehledu o expresi antigenů v různých částech pankreatu. Zjistili jsme, že u pacienta s FD je silná pozitivita antigenů krevní skupiny B v cytoplasmě acinárních buněk, kde obraz je na rozdíl od kontrolního pankreatu prakticky uniformní v rámci vyšetřené části. Vysvětlení pro tuto odlišnou distribuci je obtížné, mohlo by to být však dáno tím, že vyšetřený pacient s FD byl sekretor. Pro vztah k lysosomálnímu střídání nejsou žádné důkazy. Z korelace signálu pro antigeny krevní skupiny B s autofluorescencí ceroidu v lysosomech vyplývá, že k akumulaci glykoproteinového homologu krevní skupiny B ve střídáním postižených lysosomech nedochází. Tato zjištění však vyžadují další studie na úrovni strukturální, buněčně biologické i biochemické, zejména pro průkaz lokalizace lipidního homologu krevní skupiny B v lysosomálním systému. U kontrolního vzorku je pozitivita glykolipidů krevní skupiny B nerovnoměrně rozptýlena, což je dáno různou intenzitou mezi jednotlivými acinárními buňkami. Mozaikovitý obraz pozitivních signálů byl typický i u kontrol krevní skupiny A, což nasvědčuje o tom, že jde o obecný rys exprese krevních antigenů v pankreatu. Vzhledem k tomu, že při přípravě preparátů z parafinových řezů je většina lipidů odstraněna extrakcí, je výsledný obraz dán především přítomností glykoproteinů v tkáňových strukturách.

Exokrinní složkou pankreatu je alveolární žláza rozčleněná do lalůčků (acinů). Acinus je dutý útvar, jehož stěnu tvoří acinární buňky, které mají granulární cytoplasmu kvůli vysoké koncentraci sekrečních granul s proenzymy. Acinární buňky tvoří zhruba 85% celkové hmotnosti pankreatu. Odvod vznikající pankreatické šťávy z lalůčku zajišťuje vsunutý vývod. Buňky vsunutého vývodu jsou rozesety až do lumina lalůčků, kde vytvářejí tzv. centroacinózní buňky se světlou cytoplasmou, jelikož neobsahují sekretorní granula a proto ani antigeny krevních skupin. Endokrinní složku pankreatu reprezentují Langerhansovy ostrůvky, rozprostřené v exokrinní tkáni pankreatu, které v histologickém preparátu nevykazují žádnou expresi antigenů krevních skupin, jak patrně z naší studie (viz. str.47, Obr.12). Celý pankreas je pak obalen vazivovým pouzdem, z něhož vybíhají septa oddělující jednotlivé lalůčky [52, 53].

Ačkoliv glykolipidové antigeny krevní skupiny B představují pro FD pacienty další substrátovou zátěž, je pozoruhodné, že při klinickém posouzení funkcí pankreatu nebyly dosud popsány žádné změny. Bude jistě námětem dalších studií objasnit vysokou expresi a biologickou funkci krevních antigenů v tomto orgánu.

## **5.2. Zátěžové experimenty v buněčných kulturách**

### **5.2.1. Analýza sfingolipidů**

Při *in vitro* stanovení aktivity  $\alpha$ -GALA bez inhibice  $\alpha$ -NAGA u FD pacientů byla zjištěna sice nízká, přesto však výrazná reziduální aktivita než při inhibici  $\alpha$ -NAGA N-acetylgalaktosaminem. Tuto reziduální aktivitu vůči syntetickému  $\alpha$ -galaktosidu lze tedy přičíst převážně  $\alpha$ -NAGA. Předpokládá se, že na odbourávání přirozených substrátů  $\alpha$ -GALA se podílí právě  $\alpha$ -NAGA také *in vivo*. Je známo, že oba geny, kódující tyto enzymy, mají značnou homologii a prapůvodně vznikly duplikací ze společného genu během evoluce [24, 54].

Na odbourávání hydrofobních substrátů (mezi které patří glykosfingolipidy s méně než tetrasacharidovým řetězcem) se kromě  $\alpha$ -GALA podílí také saposin B. Při jeho deficitu v buňkách však pokles aktivity  $\alpha$ -GALA vůči ve vodě rozpustným substrátům nebyl pozorován a lze jej zjistit pouze v reakci s přirozeným substrátem jak *in vitro*, tak optimálně v zátěžovém testu v buněčné kultuře. Mechanismus jeho působení se vysvětluje tak, že saposin B napomáhá kontaktu enzym-substrát tím, že umožní vyzdvižení lipidu z membrány do intralysosomálního prostoru, kde jsou přítomny rozpustné hydrolasy [10].

Na druhé straně byl v buňkách pacientů s Schindlerovou chorobou jednoznačně potvrzen deficit  $\alpha$ -NAGA. Při měření  $\alpha$ -GALA v těchto buňkách, jak s inhibicí  $\alpha$ -NAGA i bez její inhibice, vykazuje tento enzym velice podobné hodnoty. To nasvědčuje tomu, že při deficitu  $\alpha$ -NAGA se u pacientů s Schindlerovou chorobou na odbourávání jeho substrátů  $\alpha$ -GALA nepodílí.

U buněk s deficitem  $\alpha$ -GALA byla prokázána až 4x zvýšená koncentrace Gb<sub>3</sub>Cer naproti kontrolním vzorkům. Protože přirozenými substráty tohoto enzymu jsou neutrální glykosfingolipidy s terminální  $\alpha$ -galaktosou, mezi které patří především Gb<sub>3</sub>Cer, lze tento výsledek očekávat.

V důsledku deficitu prosaposinu a saposinů také nefungují degradační reakce u některých nepolárních sfingolipidů. Prosaposin je prekurzorem všech čtyř známých saposinu A – D, které se podílejí na degradaci GSL se čtyřmi cukry a méně [10, 55]. Při jeho deficitu tak dochází ke ztrátě funkcí všech čtyř saposinů a k masivnímu ukládání GSL a ceramidu v tkáních pacienta (viz. str. 17, Obr.5.: Schéma lysosomální degradace vybraných GSL).

Přirozenými substráty  $\alpha$ -NAGA jsou glykoproteiny a glykosfingolipidy krevní skupiny A, které vzhledem ke své rozpustnosti spolupůsobení proteinových aktivátorů při degradaci nepotřebují. Skladba GSL v buňkách se proto příliš neodlišuje od kontrol, jak patrně z naší studie. Nejvýraznější změny jsme zjistili ve fibroblastech u prosaposinového deficitu (Cer, CMH – GlcCer, CDH – LacCer, Gb<sub>3</sub>Cer), v menší míře u deficitu saposinu B (Gb<sub>3</sub>Cer, CDH – LacCer) a u Fabryho nemoci (Gb<sub>3</sub>Cer, CDH – Cer). Tyto nálezy dobře korelují s dříve publikovanými nálezy v tkáních a v moči u těchto poruch [56, 57, 58].

### **5.2.2. Vyhodnocení zátěžových experimentů se substrátem [<sup>3</sup>H]B-6-2 v kulturách kožních fibroblastů**

Při zátěžových experimentech se značeným [<sup>3</sup>H]B-6-2 glykolipidem byl použit conduritol B-epoxid, nekompetitivní inhibitor  $\beta$ -glukocerebrosidasy, aby se degradační krok zastavil na úrovni  $\beta$ -glukosylceramidu. Jinak by docházelo k odbourávání produktů degradace až na ceramid a sfingoidy, které by byly použity k resyntéze sfingolipidů a na mastné kyseliny podléhající dále  $\beta$ -oxidaci na radioaktivní vodu. Tím by bylo negativně ovlivněno vyhodnocení jednotlivých stupňů katabolismu GSL [59].

V této naší studii jsme sledovali degradaci glykolipidního antigenu krevní skupiny B, [<sup>3</sup>H]B-6-2 glykolipidu, který se vedle Gb<sub>3</sub>Cer ukládá v tkáních a především v pankreatu FD pacientů, kteří mají B krevní skupinu. Dali jsme si za úkol zjistit, do jaké míry je tento

glykolipid odbourán mutantními buňkami s poruchou funkce  $\alpha$ -GALA a  $\alpha$ -NAGA v důsledku mutace v genu kódujícím enzymový protein (Fabryho choroba, Schindlerova choroba), v porovnání s poruchou funkce aktivátorů u deficitu prosaposinu a saposinu B. V buňkách s deficitem  $\alpha$ -GALA,  $\alpha$ -NAGA a saposinu B jsme nepozorovali žádnou výraznou akumulaci ani u jednoho ze sledovaných GSL.

B-6-2 glykolipid obsahuje terminální  $\alpha$ -galaktosu v pozici  $\alpha 1 \rightarrow 3$ . Jelikož přirozenými substráty  $\alpha$ -GALA jsou substráty obsahující terminální galaktosu, mělo by zde u buněk s deficitem  $\alpha$ -GALA dojít k významnému bloku v degradaci už počátečního substrátu. Celková tvorba produktu však probíhala na 41%, což v porovnání se 45% u kontrolního vzorku, vypovídá pouze o zpomaleném odbourávání B-6-2 glykolipidu. Tento výsledek ale může podpořit hypotézu o možné účasti  $\alpha$ -NAGA na degradaci tohoto poměrně hydrofilního substrátu  $\alpha$ -GALA. Navíc lze předpokládat, že B-6-2 glykolipid není na rozdíl od kritického Gb<sub>3</sub>Cer tolik zanořen do plasmatické membrány, zejména pro jeho větší počet sacharidových jednotek. Je tedy mnohem přístupnější pro daný enzym.

V případě deficitu prosaposinu byl zjištěn významný blok v odbourávání na úrovni GL-4 a GL-2. Oba tyto glykolipidy obsahují terminální galaktosu v poloze  $\beta 1 \rightarrow 4$  a enzym, který se podílí na jejich odbourávání, je  $\beta$ -galaktosidasa. V tomto případě je však potřeba významná spoluúčast aktivátorů saposinu B a C (viz. str.17, Obr.5), jejichž prekurzorem je prosaposin. Při jeho absenci tak dochází k mnohonásobné akumulaci daných substrátů. Blok v degradaci GL-3 prokázán nebyl. Tento glykolipid obsahuje terminální N-acetylglukosamin v poloze  $\beta 1 \rightarrow 3$  a enzym, který katalyzuje jeho odbourávání, je  $\beta$ -hexosaminidasa A. I v tomto případě probíhá degradace se spoluúčastí aktivátoru a to GM2, který je však kódován jiným genem než-li v případě prosaposinu. Ke ztrátě funkce GM2-aktivátoru zde nedochází a degradace probíhá normálním způsobem.

### **5.3. Příprava substrátu Gb<sub>4</sub>Cer s neradioaktivní značkou**

Důvodem této práce byl požadavek na přípravu hmotnostně značeného lipidu, který je prekursorem Gb<sub>3</sub>Cer a který by v zátěžových experimentech nahradil substrát značený radioisotopem.

Sfingolipid ceramid N-deacylasa (SCDasa, *Pseudomonas sp.* TK4) katalyzuje reverzibilní reakci, při které dochází k hydrolytickému štěpení amidové vazby mezi mastnou kyselinou a sfingoidní bází ceramidu u různých sfingolipidů včetně gangliosidů. Tato reakce je účinná při



kyselém pH a v přítomnosti vyšší koncentrace detergentu, zatímco reverzibilní reakce (reacylace sfingolipidu specifickou MK) preferuje podmínky při neutrálním pH a nižší koncentraci detergentu [60]. Práce začala testováním reakčních podmínek hydrolýzy dle odborné literatury [49, 61].

Bylo zjištěno, že štěpení amidové vazby je účinné pouze v přítomnosti různých detergentů, mezi které patří i Triton X-100 [48].

To lze vysvětlit tím, že musí dojít nejprve k rozpuštění hydrofobních glykosfingolipidů a k tvorbě micel a lipidní substráty jsou pak v této formě přístupnější pro hydrofilní enzymy [55].

Kvůli ztrátě hydrofobicity, odštěpením mastné kyseliny z Gb<sub>4</sub>Cer, je pro zpětnou reakci (resyntézu) požadován nižší obsah detergentu. Vedle Tritonu X-100 byl jako další varianta použit i BSA zejména pro jeho snadnější odstranění z roztoku, vysrážením proteinu v mezifázi mezi dvěma organickými rozpouštědly [62]. Zjistili jsme, že použití BSA bylo výhodnější i vzhledem k výtěžku hydrolýzy (30%), který byl vyšší než při použití Tritonu X-100 (15%). Z jiných studií [48] vyplývá, že výtěžky reakcí ve vodném monofázovém systému se u jiných lipidů pohybují v rozmezí 60 – 70%, což je dáno ustanovením rovnováhy mezi přímou hydrolytickou a zpětnou syntetickou reakcí. Při použití dvoufázového systému se tyto výtěžky reakcí mohou u některých lipidů pohybovat okolo 80 – 90 %, což je vysvětlováno vytřepáním mastných kyselin do organické fáze, které posune reakce ve prospěch tvorby produktů [48].

Tento druhý způsob se však v našem případě neosvědčil, výtěžek byl pouhých 13% a přibyl i problém s odstraněním n-heptadekanu z roztoku. Důvodem malých výtěžků může být inhibiční efekt heptadekanu na SCDasu, nebylo to však zatím jednoznačně prokázáno [48].

Pro provedení zpětné reakce bylo nutné zvolit vhodné reakční podmínky, které se mohou pro různé lyso-SFL měnit, jako například volba počátečního množství substrátu nebo enzymu. V případě lyso-Gb<sub>4</sub>Cer se ukázalo jako nejvhodnější použití 20 nmol substrátu na 65 mI.U. SCDasy. Důležité je zvolení správného poměru mastných kyselin k počátečnímu množství substrátu (1:1-2), nižší množství detergentu v reakci a neutrální pH. Lze předpokládat, že větší množství substrátu vůči mastným kyselinám může inhibovat zpětnou reakci tím, že dojde k zhoršenému přístupu mastných kyselin do katalytické domény SCDasy, které je okupováno lyso-derivátem [34]. Větší množství detergentu či nižší pH může vést také k inhibici reakce nebo k posunutí rovnováhy ve směru reakce opačné [60, 51].

Imobilizovaná SCDasa na celulosových částicích se již v dřívější době v laboratoři velice osvědčila při přípravě různých neradioaktivně značených sfingolipidů (např. sulfatidu, glukocerebrosidu, GM1 gangliosidu). Tato metoda využívá magnetické částice s

kovalentně imobilizovaným enzymem, kde výhodou je velice jednoduché oddělení produktů z reakční směsi za použití silných magnetů a vícenásobné použití enzymu [50].

Na rozdíl od přípravy C19:0 Gb<sub>4</sub>Cer však u těchto lipidů nebylo nutné připravovat lyso-deriváty, které byly – na rozdíl od lyso-Gb<sub>4</sub>Cer, komerčně dostupné.

Při analýze zastoupení jednotlivých isoform v resyntetizovaném C19:0 Gb<sub>4</sub>Cer jsme však zjistili přítomnost kontaminujících isoform C16:0 a C18:0 Gb<sub>4</sub>Cer. V literatuře se uvádí, že SCDasa preferuje pro reacylaci C16:0 a C18:0 mastné kyseliny a to až s 80 – 100% účinností [60]. Preference kyselin s délkou uhlíkatého řetězce C16 – C18 byla potvrzena při resyntéze sulfatidu a glukocerebrosidu, kdy resyntéza C17:0 isoformy vykazovala výtěžky v rozmezí 80-100% [50, 63].

Otázkou však zůstává původ těchto kontaminujících mastných kyselin v našem preparátu. Bylo provedeno důkladné promytí imobilizovaného enzymu, aby nemohlo dojít ke kontaminaci zbytky z předešlých experimentů. Byla provedena také kontrola čistoty komerční kyseliny nonadekanové, použité v této reakci. Při kontrole čistoty lyso-Gb<sub>4</sub>Cer, tj. produktu hydrolýzy, však byla zjištěna přítomnost volných mastných kyselin C16:0 a C18:0, které se nezdařilo z preparátu oddělit ani na HPLC koloně. Tyto mastné kyseliny byly ale detegovány v chloroform – methanolovém extraktu komerčně dodávané SCDasy. Dosavadní literatura o struktuře a vlastnostech samotné SCDasy poskytuje jen minimální informace. Existuje teorie, že obě reakce (hydrolýzu a resyntézu) katalyzuje stejná katalytická doména obsahující tryptofanové zbytky [60]. Je tedy možné, že samotný enzym při N-deacylaci glykosfingolipidů tyto mastné kyseliny váže do svého aktivního místa a opětovně použije při resyntéze. To je ale v případě, kdy pro zpětnou reakci používáme promytý imobilizovaný enzym méně pravděpodobné. Jinou možností je vazba uvolněných mastných kyselin na hydrofobní peptidy, které se mohou vyskytovat např. v preparátu BSA a mohou být zdrojem kontaminace při zpětné reakci.

V souhrnu lze říci, že navržený postup přípravy C19:0 Gb<sub>4</sub>Cer je vhodný a má dobrou výtěžnost v obou směrech reakce. Do budoucna však zbývá dořešit otázku kontaminací a isoformové čistoty finálního produktu. Pro další fázi proto navrhujeme vyzkoušet pro hydrolýzu postup s detergenty a následným přechistěním lyso-derivátu několikanásobnou HPLC a eventuálně vyzkoušet jiný typ nosiče.

## 6. Závěr

### ➤ Analýza glykokonjugátů krevní skupiny B v pankreatu u Fabryho nemoci:

- Analýza pankreatu prokázala masivní hromadění glykolipidů krevní skupiny B u FD pacienta s touto krevní skupinou (300násobné zvýšení koncentrace) v důsledku mutované, nefunkční  $\alpha$ -GALA.
- Imunohistochemickou analýzou glykoproteinů krevní skupiny B v parafinových řezech pankreatu byla zjištěna silná pozitivita antigenů krevní skupiny B v cytoplasmě acinárních buněk, homogenně rozprostřenou v exokrinní části pankreatu. Byly zjištěny i neexprimující Langerhansovy ostrůvky i centroacinózní a vazivové buňky vsunutého vývodu.

Tyto nálezy jsou významné, protože porovnáním se světovou literaturou jde teprve o druhý prokázaný případ, který potvrzuje a doplňuje dřívější zjištění Wheretta a Hakomoriho z r.1974 [22] a otvírá směr dalšímu výzkumu k vysvětlení vysoké exprese a buněčné lokalizace krevních antigenů v pankreatu.

### ➤ Metabolické experimenty v buněčné kultuře s mutacemi, které způsobují dysfunkci $\alpha$ -galaktosidasy A (Fabryho choroba, deficit prosaposinu a saposinu B)

- V buňkách FD pacientů byla *in vitro* prokázána reziduální aktivita vůči fluorogennímu substrátu pro  $\alpha$ -GALA, která byla inhibovatelná N-acetylgalaktosaminem. Tím byla ověřena účast  $\alpha$ -NAGA na degradaci substrátů  $\alpha$ -GALA v kožních fibroblastech. Deficit aktivity tohoto enzymu byl naopak prokázán v buňkách pacientů se Schindlerovou chorobou.
- Z hlediska lipidů byla chromatografickou analýzou a ESI-MS/MS zjištěna až 4x vyšší koncentrace Gb<sub>3</sub>Cer ve fibroblastech pacienta s deficitem  $\alpha$ -GALA. U deficitu saposinu B jsme pozorovali pouze mírně zvýšený Gb<sub>3</sub>Cer a u pacienta s deficitem prosaposinu byl dle očekávání zjištěn vyšší obsah Cer a GlcCer, LacCer a Gb<sub>3</sub>Cer.
- Při zátěžových experimentech *in situ* s nově připraveným [<sup>3</sup>H]B-6-2 glykolipidem nebyl v buňkách s deficitem  $\alpha$ -GALA prokázán blok v prvním stupni degradace tohoto substrátu, kdy je odštěpována terminální  $\alpha$ -galaktosa. Tento výsledek opět nasvědčuje o účasti  $\alpha$ -NAGA na štěpení přirozených substrátů  $\alpha$ -GALA. V buňkách s deficitem prosaposinu byl dle očekávání zjištěn blok v odbourávání glykolipidu se čtyřmi a

dvěma cukry na úrovni ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) galaktosy. V buňkách s deficitem  $\alpha$ -NAGA a saposinu B jsme nepozorovali žádné významné hromadění sledovaných glykolipidů.

- Byla připravena enzymová metoda syntézy Gb<sub>4</sub>Cer s neradioaktivní značkou (C19:0 Gb<sub>4</sub>Cer), který by v dalších experimentech nahradil substrát značený radioisotopem [<sup>3</sup>H]Gb<sub>4</sub>Cer. Metoda bude aplikovatelná i na další glykolipidy, zbývá dořešit isoformovou čistotu finálního preparátu.

## 7. Seznam použité literatury

1. Wennekkes T., van den Berg R. J. B. H. N., Boot R. G., van der Marel G. A., Overkleeft H. S., Aerts J. M. F. G.: *Glycosphingolipids-Nature, Function, and Pharmacological Modulation*,: Angew. Chem. Int. Ed. Engl., **2009**, 48, 8848-8850
2. Merrill A. H., Wang M. D., Park M., Sullards M. C.: *(Glyco)sphingolipidology: an Amazony challenge and opportunity for systems biology*, Trends Biochem. Sci., **2007**, 32, 457-468
3. Chester M. A.: *Nomenclature of Glycolipids*, IUPAC, Pure Appl. Chem., **1997**, 69, 2475-2487
4. Chester M. A.: *IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN.) Nomenclature of Glycolipids*, Eur. J. Biochem., **1998**, 257, 293-298
5. Voet D., Voetová J. G.: *Biochemie*, Victoria Publishing Praha, **1995**, 751-753
6. van Meer G., Voelker D. R., Feigenson G. W.: *Membrane lipids: where they are and how they behave*, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., **2008**, 9, 112-124
7. Cowart L. A., Shotwell M., Worley M. L., Richards A. J., Montefusco D. J., Hannun Y. A., Lu X.: *Revealing a signaling role of phytosphingosine-1-phosphate in yeast*: Mol. Syst. Biol., **2010**, 349, 1-9
8. Hannun Y. A., Obeid L. M.: *Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids*, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., **2008**, 9, 139-150
9. Cao X., Coskun Ü., Rössle M., Buschhorn S. B., Grzybek M., Dafforn T.R., Lenoir M., Overduin M., Simons K.: *Golgi protein FAPP2 tubulates membranes*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **2009**, 106, 21121-21125
10. Kolter T., Sandhoff K.: *Lysosomal degradation of membrane lipids*,: FEBS Lett., **2010**, 584, 1700-1712
11. Schulze H., Kolter T., Sandhoff K.: *Principles of lysosomal membrane degradation: Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation*, Biochim. Biophys. Acta, **2008**, 1793, 674-683
12. Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: *Vnitrobuněčné oddíly a transport*, v knize *Základy buněčné biologie* (Alberts B., ed.), Espero Publishing Ústí nad Labem, **2005**, 447 – 480
13. Kolter T., Sandhoff K.: *Sphingolipid metabolism diseases*, Biochim. Biophys. Acta, **2006**, 1758, 2057-2079
14. Ahn V. E., Faull K. F., Whitelegge J. P., Fluharty A. L., Privé G. G.: *Crystal structure of saposin B reveals a dimeric shell for lipid binding*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **2003**, 100, 38-43
15. Sandhoff K., Kolter T.: *Processing sphingolipid activator proteins and the topology of lysosomal digestion*, Acta Biochim. Pol., **1998**, 45, 373-384
16. Elstein D., Altarescu G., Beck M.: *Fabry disease*, Springer-Verlag GmbH, Berlin, Germany, **2010**, 125-350
17. Germain D. P.: *Fabry disease*, Orphanet J. Rare Dis., **2010**, 5, 1-49
18. Chen Y., Jin M., Goodrich L., Smith G., Coppola G., Calhoun D., H.: *Purification and characterization of human  $\alpha$ -galactosidase A expressed in insect cells using a baculovirus vector*, Protein Expr. Purif., **2000**, 20, 228-236
19. Dobrovolný R.: *Metabolic studies of blood group glycosphingolipids in lysosomal  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase and  $\alpha$ -galactosidase A deficiencies (Schindler and Fabry disease)*, Diplomová práce, Přf Univerzity Karlovy v Praze, katedra biochemie, **1999**, 9-44
20. Aerts J. M., Groener J. E., Kuiper S., Donker-Koopman W. E., Strijland A., Ottenhoff R., van Roomen C., Mirzaian M., Wijburg F. A., Linthorst G. E., Vedder A. C.,

- Rombach S. M., Cox-Brinkman J., Somerharju P., Boot R. G., Hollak C. E., Brady R. O., Poorthuis B. J.: *Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **2008**, 105, 2812-2817
21. Desnick J., Iannou Y. A., Eng C. M.: In: Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D.: *The Metabolic Basis of Inherited Disorders 7<sup>th</sup> edition*, McGraw-Hill, New York **1995**, 2741-2784
  22. Wherrett J. R., Hakomori S. I.: *Characterization of a blood group B glycolipids, accumulating in the pancreas of a patient with Fabry's disease*, J. Biol. Chem., **1973**, 248, 3046 – 3051
  23. Ledvinová J., Poupětová H., Hanáčková A., Písačka M., Elleder M.: *Blood Group B glycosphingolipids in  $\alpha$ -galactosidase deficiency (Fabry disease): influence of secretors status*, Biochim. Biophys. Acta, **1997**, 1345, 180-187
  24. Wang A. M., Desnick R. J.: *Structural organization and complete sequence of the human  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase gene: homology with the  $\alpha$ -galactosidase A gene provides evidence for evolution from a common ancestral gene*, Genomics, **1991**, 10, 133-142
  25. Nathaniel E. C., Scott C. G.: *The 1,9 Å structure of human  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase: the molecular basis of Schindler and Kanzaki diseases*, J. Mol. Biol. **2009**, 393, 435-447
  26. Sikora J., Harzer K., Elleder M.: *Neurolysosomal pathology in human prosaposin deficiency suggests essential neurotrophic function of prosaposin*, Acta Neuropathol., **2007**, 113, 163-175
  27. King M. J.: *Blood group antigens on human erythrocytes-distribution, structure and possible function*, Biochim. Biophys. Acta, **1994**, 1197, 15-44
  28. Schenkel-Brunner H.: *Blood-group-ABH antigens of human erythrocytes. Quantitative studies on the distribution of H antigenic sites among different classes membrane components*, Eur. J. Biochem., **1980**, 104, 529-534
  29. Smolarek D., Watorek A. K., Waśniowska K., Czerwiński M.: *Molecular background of the ABO blood group system*, Postepy High Med. Dosw., **2008**, 62, 4-17
  30. Kubiczková L.: *Genetická determinace a variabilita krevních skupin systému ABO*, Bakalářská práce, Příf Masarykovy univerzity v Brně, katedra molekulární biologie a genetiky, **2008**, 15-18
  31. Meloncelli P. J., Lotary T. L.: *Synthesis of ABO histo-blood group type I and II antigens*, Carbohydr. Res., **2010**, 345, 2305-2322
  32. Brunner H. S.: *Human Blood Groups*, Springer-Verlag Wien, New York, **2000**, 68-200
  33. Stults C. L., Sweeley C. C., Macher B. A.: *Glycosphingolipids: structure, biological source, and properties*, Methods Enzymol., **1989**, 179, 167-214
  34. Suzuki K.: *The pattern of mammalian brain gangliosides-II. Evaluation of the extraction procedures, postmortem changes and the effect of formalin preservation*, J. Neurochem., **1965**, 12, 629-638
  35. Groener J. E. M., Poorthuis B. J. H. M., Kuiper S., Helmond M. T. H., Hollak C. E. M., Aerts J. M. F. G.: *HPLC for simultaneous quantification of total ceramide, glucosylceramide, and ceramide trihexoside concentrations in plasma*, Clin. Chem., **2007**, 53, 742-747
  36. Jennings K. R.: *The changing impact of the collision-induced decomposition of ions on mass spectrometry*, Int. J. Mass Spect., **2000**, 200, 479-493
  37. Murphy R. C., Fiedler J., Hevko J.: *Analysis of nonvolatile lipids by mass spectrometry*, Chem. Rev., **2001**, 101, 479-526

38. Kuchař L.: *Tandem mass of sphingolipids and its application in diagnosis of sulphatidosis and related diseases*, Diplomová práce, Přf Univerzity Karlovy v Praze, katedra biochemie, **2006**, 20-62
39. Liebisch G., Drobnik W., Reil M., Trümbach B., Arnecke R., Olgemöller B., Fischer A., Schmitz G.: *Quantitative measurement of different ceramide species from crude cellular extrakt by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS)*, J. Lipid. Res., **1999**, 40, 1539-1546
40. Hartree E. F.: *Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response*, Anal. Biochem., **1972**, 48, 422-427
41. Feizi T., Stoll M. S., Yuen C. T., Chai W., Lawson A. M.: *Neoglycolipids: probes of oligosaccharides structure, antigenicity, and function*, Methods Enzymol., **1994**, 230, 484-519
42. Svennerholm L.: *The quantitative estimation of cerebrosides in nervous tissue*, J. Neurochem., **1956**, 1, 42-53
43. Iwamori M., Sunada S., Ishihara E., Moki M., Fujimoto S., Nagai Y.: *Differential expression of fucosyl GM1 and a disialoganglioside with a NeuAc alpha 2-6GalNAc linkage (GD1e) in various rat ascites hepatoma cells*, FEBS Lett., **1986**, 198, 66-70
44. Asfaw B., Ledvinová J., Dobrovolný R., Bakker H. D., Desnick R. J., van Diggelen O. P., de Jong J. G. N., Kanzaki T., Chabas A., Maire I., Conzelmann E., Schindler D.: *Defects in degradation of blood group A and B glycosphingolipids in Schindler and Fabry diseases*, J. Lipid. Res., **2002**, 43, 1096-1104
45. Keslová J.: *Impaired degradation of glycosphingolipid in lysosomal storage diseases*, Diplomová práce, Přf Univerzity Karlovy v Praze, katedra biochemie, **2003**, 25-29
46. Wenger D. A., Williams C.: *Screening for lysosomal disorders in techniques in diagnostic human biochemical genetics: A Laboratory Manual*, Wiley-Liss Inc., **1991**, 578-617
47. Folch J., Less M., Sloane S. J.: *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*, J. Biol. Chem., **1957**, 226, 497-509
48. Kurita T., Izu H., Sano M., Ito M., Kato I.: *Enhancement of hydrolytic activity of sphingolipid ceramide N-deacylase in the aqueous-organic biphasic system*, J. Lipid res., **2000**, 41, 846-851
49. Ito M., Kurita T., Kita K.: *A novel enzyme that cleaves the N-acyl linkage of ceramides in various glycosphingolipids as well as sphingomyelin to produce their lyso forms*, J. Biol. Chem., **1995**, 270, 24370-24374
50. Kuchař L., Rotková J., Asfaw B., Lenfeld J., Horák D., Korecká L., Bílková Z., Ledvinová J.: *Semisynthesis of C17:0 isoforms of sulphatide and glucosylceramide using immobilized sphingolipid ceramide N-deacylase for application in analytical mass spectrometry*, Rapid Commun. Mass spectrom., **2010**, 24, 2393-2399
51. Mitsutake S., Kita K., Nakagawa T., Ito M.: *Enzymatic synthesis of <sup>14</sup>C-glycosphingolipids by reverse hydrolysis reaction of sphingolipid ceramide N-deacylase: Detection of endoglycoceramidase activity in a seaflower*, J. Biochem., **1998**, 123, 859-863
52. Stenberg S. S.: *Histology for Pathologists*, Lippincott-Raven Publishhers, Philadelphia, New York, **1997**, 613-650
53. Dabbs D. J.: *Diagnostic Immunohistochemistry*, Elsevier Inc., Philadelphia, USA, **2006**, 442-508
54. Hujová J., Sikora J., Dobrovolný R., Poupětová H., Ledvinová J., Kostrouchová M., Hřebíček M.: *Characterization of gana-1, a Caenorhabditis elegans gene encoding a single ortholog of vertebrate alpha-galactosidase and alpha-N-acetylgalactosaminidase*. BMC Cell. Biol., **2005**, 5, 1-13

55. Sandhoff K., Kolter T.: *Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids*, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., **2003**, 358, 847-861
56. Kuchař L., Ledvinová J., Hřebíček M., Myšková H., Dvořáková L., Berná L., Chrastina P., Asfaw B., Elleder M., Petermöller M., Mayrhofer H., Staudt M., Krägeloh-Mann I., Paton B. C., Harzer K.: *Prosaposin deficiency and saposin B deficiency (activator-deficient metachromatic leukodystrophy): report on two patients detected by analysis of urinary sphingolipids and carrying novel PSAP gene mutations*, Am. J. Med. Genet. A, **2009**, 149, 613-21
57. Elleder M., Jeřábková M., Befekadu A., Hřebíček M., Berná L., Ledvinová J., Hůlková H., Rosewich H., Schymik N., Paton BC, Harzer K.: *Prosaposin deficiency -- a rarely diagnosed, rapidly progressing, neonatal neurovisceral lipid storage disease. Report of a further patient*, Neuropediatrics., **2005**, 36, 171-80
58. Hůlková H., Červenková M., Ledvinová J., Tocháčková M., Hřebíček M., Poupětová H., Befekadu A., Berná L., Paton B. C., Harzer K., Böör A., Šmíd F., Elleder M.: *A novel mutation in the coding region of the prosaposin gene leads to a complete deficiency of prosaposin and saposins, and is associated with a complex sphingolipidosis dominated by lactosylceramide accumulation*, Hum. Mol. Genet., **2001**, 10, 927-40
59. Asfaw B., Schindler D., Ledvinová J., Černý B., Šmíd F., Conzelmann E.: *Degradation of blood group A glycolipids A-6-2 by normal and mutant human skin fibroblasts*, J. Lipid Res., **1998**, 39, 1768-1780
60. Kita K., Kurita T., Ito M.: *Characterization of reversible nature of the reaction catalyzed by sphingolipid ceramide N-deacylase*, Eur. J. Biochem., **2001**, 268, 592-602
61. Suzuki Y., Hirabayashi Y., Matsumoto M.: *Hydrazinolysis of glycosphingolipids. A new method for preparation of N-deacylated (lyso) glycosphingolipids*, J. Biochem., **1984**, 95, 1219-1222
62. Mills K., Johnson A., Winchester B.: *Synthesis of novel internal standards for the quantitative determination of plasma ceramide trihexoside in Fabry disease by tandem mass spectrometry*, FEBS Lett., **2002**, 515, 171-176
63. Futerman A. H.: *Intracellular trafficking of sphingolipids: relationship to biosynthesis*, Biochim. Biophys. Acta, **2006**, 1758, 1885-1892



**Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.**

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka